



Diogo Jorge Martins Ramos

Licenciatura em Ciências de Engenharia de Materiais

Desenvolvimento de Revestimentos de Vidro Bioativo por CoBlast™

Dissertação para Obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia de Materiais

Orientador: Doutor João Paulo Miranda Ribeiro Borges,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-orientadores: Doutor Eduardo Ascenso Pires, CERAMED
Doutor Jorge Alexandre Monteiro Carvalho Silva,
Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Júri

Presidente: Doutor João Pedro Botelho Veiga, Professor
Auxiliar, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Arguentes: Doutor Regina Maria Corredeira da Conceição
Monteiro, Professora Associada do Departamento
de Ciência dos Materiais, da Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro, 2016

Desenvolvimento de Revestimentos de Vidro Bioativo por CoBlast™

Copyright © Diogo Jorge Martins Ramos, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

‘In this bright future you can't forget your past.’

Bob Marley

Agradecimentos

Para esta última etapa do meu percurso académico muitas foram as pessoas que tiveram um desempenho fulcral, mas além dessas, não posso deixar de dar a devida importância às que me acompanharam também ao longo destes (muitos) anos.

Em primeiro lugar, ao meu orientador, Professor João Paulo Borges, por além de me ter dado o privilégio de participar neste projeto, me ter dado todo o apoio possível e por ter uma incansável disponibilidade (tanto durante a dissertação como durante o curso inteiro). O meu muitíssimo obrigado por tudo o que me foi transmitido.

Ao co-orientador Professor Doutor Jorge Carvalho Silva, pelo acompanhamento dado e pela disponibilidade apresentada num meio um tanto ao quanto desconhecido para mim como era o caso das culturas celulares. Muito obrigado.

Ao co-orientador Doutor Eduardo Ascenso Pires por ter disponibilizado as instalações da CERAMED sem as quais este projeto não poderia avançar.

À Engenheira Ana Oliveira da CERAMED pelo apoio prestado e pela orientação dada num ambiente desconhecido para mim. Sem isso, certamente não existiriam revestimentos. Obrigado!

Um agradecimento geral a todos os docentes, em especial os do DCM, que ao longo destes anos me foram transmitindo todos os conhecimentos que me ajudaram a ultrapassar os obstáculos que um curso superior oferece. Também um agradecimento especial ao secretariado do DCM por toda a ajuda e também por todos os momentos e horas “extra” vividos em inúmeros eventos.

Ao Pedro Duarte, por ter sido aquele companheiro de todo um primeiro ano na universidade. Muitas foram as aventuras, loucuras e traumas, mas acima de tudo ficam as memórias de um dos melhores anos de sempre. Um grande obrigado e fico à espera da viagem a Marrocos!

Ao João Pires, pelas jantaradas e noites de estudo em Telheiras. Pelos grandes jogos do Benfica. E obviamente, pelo apoio e companhia naquelas aulas duras. Obrigado!

Ao Pedro Sousa, um dos maiores responsáveis por me incutir alguma responsabilidade nos momentos difíceis. O companheiro dos assuntos sérios. Obrigado por toda a ajuda que me deste durante esta dissertação, principalmente a nível da escrita, mas não

só. Um obrigado ainda maior, sem ti, possivelmente não teria vindo parar a este curso e não estaria a escrever estas palavras.

Hugo Godinho, companheiro da 203. Só o facto de estares presente nessa sala durante tantas noites já ajudou. O resto nem é preciso dizer. Obrigado.

Um agradecimento a quem me acompanhou de mais perto durante a maior parte deste meu percurso. Mariana Castanheira muito obrigado por toda a ajuda que me deste ao longo destes anos, foste sem dúvida a maior ajuda e aquela “moleta” que tantas vezes precisei e usei e abusei.

Um agradecimento especial também àquela família das quarta-feiras. Ricky boy, ajuda preciosa a Sensores, grandes conversas profundas debaixo de um chapéu de sol que nem idosos. E claro, claríssimo, “Bjgó”. Bjgó, bjgó...só de pensar que me ia esquecendo de ti desmancho-me a rir. Mas que PowerPoint mágico! Tudo começou com um olhar ameaçador e com desprezo da tua parte numa tentativa minha de ajudar no ENEM. Daí, rapidamente saltaste para a fã nº1 do meu êxito de verão Chandellier. E agora, falamos de Game of Thrones e mudo lâmpadas em tua casa. No meio disto tudo, fartaste-te de ajudar nesta minha atrofiante passagem na FCT. O melhor que te consigo agradecer é através de uma promessa de te contratar para a minha futura empresa com contrato vitalício e uma baba de camelo que estou a dever há muito tempo. Mas agora a sério, muito, mas mesmo muito obrigado por toda a ajuda. Já dizia o outro...Impecábel.

Ao Rafael Medeiros, daqueles afilhados de faculdade que quase se transformam em irmãos mais novos. Muito obrigado por todo o apoio que me deste principalmente neste último ano. E falando em afilhados, Rodrigo Almeida, também tu mereces o meu total agradecimento! Muitas foram as vezes de pânico naquelas cadeiras demoníacas.

A toda a família de materiais, são tantos os nomes que marcaram. A todos os que fazem e fizeram parte desta enorme família, um muitíssimo obrigado, só dessa forma me sentiria tão bem ao longo destes anos. Foi a minha casa e vocês sem dúvida a minha segunda família.

À minha família, ao meu avô, à minha avó, ao meu grande primo Daniel, aos meus tios, aos meus primos. Todos me tornaram na pessoa que sou hoje. Obrigado!

Por último, mas o agradecimento mais importante de todos sem qualquer dúvida. Aos meus pais, Fernando e Dulce, por toda a paciência, todos os conselhos mas acima de tudo por todo o amor e apoio incondicional que me deram em toda a minha vida. Foram vocês que proporcionaram este momento na minha vida com muito esforço e dedicação. Não há palavras que possam descrever a minha gratidão. Um muito, muito obrigado!

Resumo

Os vidros bioativos estudados até aos dias de hoje apresentam excelentes resultados em termos de biocompatibilidade, bioatividade, osteocondutividade e na sua capacidade osteogénica. Dos vidros bioativos estudados, salienta-se o 45S5 ou *Bioglass*® produzido através do processo de fusão. Este trabalho pretende reproduzir o 45S5 através de um método de processamento alternativo – sol-gel – que é mais simples, não envolve altas temperaturas (mais económico) e produz pós de reduzidas dimensões, aumentando a área superficial e consequentemente a bioatividade.

Os pós produzidos por sol-gel foram analisados através de FTIR e DRX para estudo da composição química e cristalográfica respetivamente e ensaios de citotoxicidade para avaliação da biocompatibilidade. Os resultados foram positivos podendo o material ser usado como revestimento. O *CoBlast*™ foi a técnica de revestimento utilizada com o objetivo de analisar se se trata de um processo mais eficaz (tecnológica e economicamente) do que o processo térmico de spray (na variante de spray por plasma). Foram revestidas placas de Ti-6Al-4V com 3 misturas diferentes. Uma com HAp para efeitos de controlo, outras com 20% de vidro bioativo e 80% de HAp (mistura A) e outra com 35% de vidro bioativo e 65% de HAp (mistura B), percentagens essas em volume. Para o revestimento foi ainda usado pó abrasivo de alumina na proporção de 50/50 v/v (mistura/abrasivo). Os revestimentos foram analisados em SEM e EDS para estudo da morfologia, rugosidade e composição do revestimento e através de ensaios de adesão celular para estudo da bioatividade. Ficou demonstrado que os revestimentos foram bem efetuados, apresentando-se superfícies homogéneas, contínuas, sem falhas e fraturas. Através ensaios de adesão e proliferação celular, ficou provado que o as amostras com vidro bioativo apresentam melhores taxas de adesão, com 17% para a mistura A e 22% para a mistura B de mais células quando comparado com a placa sem revestimento. A proliferação celular demonstra que há um crescimento das células ao longo dos dias, mais propriamente de 203% para a mistura A e 149% para a B.

Palavras-chave: sol-gel; vidro bioativo; *CoBlast*™; revestimento; 45S5; Ti-6Al-4V

Abstract

The bioactive glasses studied up to today have excellent results in terms of biocompatibility, bioactivity, osteoconductive and its osteogenic capacity. From the bioactive glasses studied, it is noted the known commercially as 45S5 - Bioglass® - produced by melt-quenching process. This dissertation aims to reproduce the 45S5 by an alternative processing method - sol-gel - that is simpler and does not involve high temperatures (more economical) and produces powders with small dimensions, increasing the surface area and hence the bioactivity.

The powders produced by sol-gel were analyzed using FTIR and XRD evaluate their chemical composition and crystallinity and cytotoxicity assays to evaluate its biocompatibility. The results were positive so the material produced may be used as a coating. CoBlast™ coating technique was used with the aim of analyzing whether it is a more effective process (technologically and economically) than the plasma spraying (variation of thermal spraying). Ti-6Al-4V plates were coated with 3 different mixtures. One with HAp for control purposes, other with 20% of bioactive glass and 80% of HAp and one with 35% of bioactive glass and 65% Hap, percentages by volume. For the coating was also used alumina abrasive powder in 50/50 v/v (mixture / abrasive). Coatings were analyzed by SEM and EDS to study the morphology, surface roughness and coating composition and by cell adhesion assays to study the bioactivity. It was demonstrated that the coatings were well made, presenting surfaces with high homogeneity, continuous, without faults and fractures. Through cell adhesion and proliferation tests it was proved that the samples of bioactive glass have better adhesion rates, with 17% for mixture A and 22% for mixture B more cells when compared to the uncoated plate. Cell proliferation demonstrates that there is cell growth over the days, more specifically a grown up of 203% for mixture A and 149% for mixture B at the 9th day of tests when compared to day 1.

Keywords: sol-gel; bioactive glass; CoBlast™; coating; 45S5; Ti-6Al-4V

Índice Geral

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract	ix
Índice Geral.....	xi
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Figuras	xv
Lista de Acrónimos e Símbolos	xvii
1 Introdução	1
1.1 Vidros Bioativos – Propriedades e comportamento.	1
1.2 Biovidro produzido através de sol-gel.....	3
1.3 Processos de revestimento - CoBlast™.....	4
2 Materiais e Métodos.....	7
2.1 Materiais.....	7
2.2 Preparação de vidro bioativo através de Sol-Gel.....	7
2.3 Revestimento através de <i>CoBlast</i> ™.....	8
2.4 Caraterização.....	10
3 Análise e Discussão de Resultados.....	15
3.1 Estrutura química do vidro bioativo (FTIR).....	15
3.2 Análise cristalográfica dos pós de vidro bioativo (DRX).....	16
3.3 Análise citotóxica dos pós de vidro bioativo.....	18
3.4 Análise Estrutural e Composição Elementar das placas revestidas (SEM e EDS).....	20
3.5 Análise da adesão celular às placas revestidas	25
4 Conclusões e Perspetivas Futuras	29
5 Referências	33
6 Anexos	37
6.1 Anexo 1 – Resultados dos ensaios de EDS	37

Índice de Tabelas

Tabela 2-1 – Quantidade de cada componente nas misturas usadas no revestimento.....	9
Tabela 3.1 – Resultados dos ensaios de citotoxicidade ao pó de vidro bioativo.....	18
Tabela 3.2 – Taxa de adesão relativa ao revestimento de Ti das 4 amostras analisadas e respectivas incertezas.	25
Tabela 3.3 – Valores das taxas de proliferação celular para cada amostra ao longo dos 5 dias de ensaios e relativas incertezas.	26

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Esquema ilustrativo do processo de CoBlast em modo <i>single-nozzle</i> [18]..	5
Figura 2.1 – Equipamento utilizado no processo de revestimento por CoBlast™. A imagem a) corresponde à câmara principal onde se dá o revestimento, a imagem b) corresponde à área que contém o recipiente onde é colocada a mistura a depositar e a imagem c) corresponde ao substrato onde são colocadas as placas de Ti-6Al-4V a revestir.	9
Figura 3.1 – Espectro do ensaio de FTIR em modo de absorvância do vidro bioativo..	15
Figura 3.2 – Difractogramas obtidos por DRX da amostra não sinterizado (preto) e com sinterização completa (azul)	17
Figura 3.3 – Imagens retiradas através de SEM representativas da placa de Ti-6Al-4V sem revestimento. A1 com ampliação de 200x; A2 com ampliação de 1000x.....	20
Figura 3.4 - Imagens retiradas através de SEM representativas da placa de Ti-6Al-4V revestidas com HAp comercial. B1 com ampliação de 200x; B2 com ampliação de 1000x; B3 com ampliação de 3000x; B4 corresponde ao espectro retirado por EDS em toda a área desta amostra.	21
Figura 3.5 - Imagens retiradas através de SEM representativas da placa de Ti-6Al-4V revestias com a mistura A. C1 com ampliação de 200x; C2 com ampliação de 1000x; C3 com ampliação de 3000x.	22
Figura 3.6 - Imagens retiradas através de SEM representativas da placa de Ti-6Al-4V revestida com a mistura B. D1 com ampliação de 200x; D2 com ampliação de 1000x; D3 com ampliação de 3000x; D4 trata-se do espectro retirado por EDS de toda a área da amostra.	23
Figura 3.7 – Gráfico de barras da proliferação celular das 4 amostras analisadas ao longo dos 5 dias de ensaios.	27
Figura 6.1 – Imagem de SEM da amostra revestida com HAp. Espectro retirado encontra-se na figura 3.4 da página 22.	37
Figura 6.2 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “ <i>Spectrum 1</i> ”).	38
Figura 6.3 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “ <i>Spectrum 2</i> ”).	39
Figura 6.4 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “ <i>Spectrum 3</i> ”).	40

Figura 6.5 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “ <i>Spectrum 4</i> ”)	41
Figura 6.6 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp. O espectro encontra-se na figura 3.6 da página 24.	42
Figura 6.7 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “ <i>Spectrum 1</i> ”)	43
Figura 6.8 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “ <i>Spectrum 2</i> ”)	44
Figura 6.9 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “ <i>Spectrum 3</i> ”)	45
Figura 6.10 – Mapeamento da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp.	46

Lista de Acrónimos e Símbolos

BSE – Eletrões retrodifundidos (Backscattered electrons)

C₀ – Concentração inicial (máximo de concentração de vidro bioativo)

CC – Controlo de Células

C+ - Controlo positivo

C- - Controlo negativo

DMSO – Dimetilsulfóxido

DRX – Difração de raios-X (X-ray Diffraction)

EDS – Energy Dispersive X-Ray

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

HAp – hidroxiapatite

HCA – Hydroxycarbonate apatite

KBr – Brometo de potássio

PBS – Phosphate buffered saline

Rpm – Rotações por minuto

SEM – Microscopia Eletrónica de Varrimento (Scanning Electron Microscope)

TEOS – Tetraetil ortossilicato

TEP – Trietil fosfato

v/v – Fração volúmica

T. adesão relat. CC (i) – Taxa de adesão relativa a CC de uma das amostras (i)

T. adesão relat. Ti (i) – Taxa de adesão relativa a Ti de uma das amostras (i)

T. de Prolif. (i) – Taxa de proliferação de uma das amostras (i)

σ – Desvio Padrão

σ_{CM} – Desvio padrão do controlo de meio

1 Introdução

1.1 Vidros Bioativos – Propriedades e comportamento.

Um biomaterial é uma substância que foi engendrada para ganhar forma e, só ou fazendo parte de um sistema complexo, é usada diretamente, controlando as interações com componentes dos sistemas biológicos do ser humano, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico (Williams, 2009). Têm como objetivo melhorar as condições de vida do ser humano. Os biomateriais podem ser artificiais ou de origem biológica. A nível artificial podem pertencer a qualquer uma das classes de materiais (cerâmicos, polímeros, metais e compósitos) (Nicholson, 2002).

A presente dissertação tem como foco um biomaterial cerâmico, mais precisamente os biovidros. O primeiro vidro bioativo foi inventado por *Larry Hench*, em 1969, na Universidade da Florida na tentativa de criar um material que estabelecesse uma ligação forte com o osso [1,2]. *Hench* decidiu produzir um vidro biodegradável através do sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$, com uma elevada concentração de cálcio. Descobriu-se que vidros bioativos com a composição de 46.1 mol.% SiO_2 , 24.4 mol.% Na_2O , 26.9 mol.% CaO e 2.6 mol.% P_2O_5 formam uma ligação com o osso tão forte que a única maneira de a remover é através da quebra do próprio. Esse vidro bioativo, com essa composição, foi posteriormente denominado de 45S5 e *Bioglass®* e continua a ser o material de referência na área [3]. Além da rápida e forte ligação que forma com o osso, foi também provado que o vidro 45S5 estimula o crescimento ósseo em zonas circundantes à interface implante-osso (propriedades osteogénicas). A ligação estabelecida com o osso é de extrema importância e esta é explicada inicialmente pela formação de uma camada de *HCA* (*hydroxycarbonate apatite*). O *HCA* é um composto bastante idêntico ao mineral ósseo, e este interage com fibrilas colagénicas de forma a se integrar, o que leva consequentemente à ligação entre o implante/osso, com o tecido orgânico. Esta substância forma-se a partir dos produtos de dissolução do vidro bioativo. A formação de *HCA* foi relacionada com 5 fases: primeiro, uma rápida troca iónica entre Na^+ e/ou Ca^{2+} com iões H^+ existentes na solução, formando ligações silanol ($\text{Si}-\text{OH}$) à superfície do vidro bioativo. Nesta fase há um aumento do pH e forma-se uma camada rica em Si à superfície. Se a composição inicial do vidro contiver fosfato, este é também dissolvido e consequentemente perdido; numa segunda fase, o alto valor do pH da solução

promove o ataque à rede de sílica por parte de iões OH^- , conduzindo à rutura das ligações Si-O-Si. A sílica dissolve-se e entra na solução na forma de $\text{Si}(\text{OH})_4$, deixando ainda mais Si-OH, na superfície vidro-solução; em terceiro, dá-se uma condensação de grupos Si-OH perto da superfície do vidro, promovendo uma re-polimerização da camada rica em sílica; Segue-se uma migração de Ca^{2+} e de grupos PO_4^{3-} para a superfície através da camada rica em sílica e da solução, formando um filme rico em $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, amorfo, á superfície da camada de sílica; por fim, com a incorporação de carbonatos e grupos hidroxilo da solução e cristalização de $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ forma-se o filme de *HCA* [4, 5]. Ainda que os fenómenos não sejam totalmente compreendidos, sabe-se que devido à camada de *HCA* formada à superfície, torna-se possível a adsorção de proteínas pelo vidro e, deste modo, as células osteogénicas são atraídas, produzindo a matriz óssea. Segundo *Wilson*, uma das propriedades mais notórias e interessantes no vidro bioativo trata-se da sua propriedade “osteoprodutora” [6]. Esta propriedade permite que se possa formar osso, não só na interface implante-osso, mas também noutras zonas unicamente constituídas por vidro bioativo [7]. O 45S5 foi usado cerca de um milhão de vezes em pacientes para reparação óssea mas, apesar das características já apresentadas, estes não têm sido uma aposta tão frequente como se esperava. Em grande parte, pode ser explicado pelas suas fracas propriedades mecânicas, não podendo ser usados como material de suporte (substituto ósseo). Apesar de ótimos resultados experimentais, do ponto de vista médico, algumas condicionantes são apresentadas. Os materiais usados nas experiências (tal como na generalidade dos vidros bioativos) foram processados através da técnica de fusão idêntica à dos vidros tradicionais, usando moldes de tamanhos fixos. Por enquanto, a grande escala, a criação de moldes individuais é comercialmente inviável. Deste modo, sabendo que o vidro bioativo se trata de um material que substitui com sucesso os implantes metálicos e poliméricos, surge a necessidade de se processar este material de forma a ser, de certo modo, unidimensional. A solução passa pelo uso de implantes metálicos ou poliméricos que desempenhem a função estrutural revestidos com vidro bioativo que desempenha então a função biológica necessária [8]. O uso deste material como revestimento bioativo permite que os implantes metálicos e poliméricos (bioinertes) ganhem estabilidade, promovendo uma ligação coesa com o tecido orgânico [9]. Apesar do sucesso aparente desta descoberta, existem obviamente contratempos. Anteriormente foi explicado que a ligação que o vidro bioativo estabelece com o osso deve-se em grande parte à formação de uma camada de *HCA* à superfície, resultado da dissolução do próprio vidro. Os vidros bioativos por natureza são biodegradáveis. Quer isto dizer que, um revestimento que seja altamente bioativo tem a tendência para se degradar ao longo do tempo. Trata-se de um problema crucial visto que, após algum tempo de aplicabilidade, o revestimento começa a desaparecer expondo o me-

tal/polímero do implante ao organismo. Caso durante esse tempo o organismo não tenha conseguido recuperar na totalidade, irá ser formado um encapsulamento fibroso, originando inflamações. Este fenómeno limita grandemente a aplicabilidade dos revestimentos de vidro bioativo [6]. O método de processamento geralmente usado é também um problema. O Biovidro 45S5, embora amorfo no fim do seu processamento por fusão, após a etapa de sinterização (indispensável para um bom revestimento) tem tendência para cristalizar. Caso se dê a cristalização, o vidro pode perder as propriedades desejadas. Cristalizado, os produtos de dissolução poderão ser diferentes, traduzindo-se numa diminuição ou até mesmo impossibilidade total de formação da indispensável camada de HCA [10]. A solução passa então por duas hipóteses: alterar a constituição do vidro para que este não cristalice após a sinterização; uso de outro método de processamento. O presente trabalho incide num método de processamento alternativo, o método por sol-gel.

1.2 Biovidro produzido através de sol-gel

Como referido anteriormente, o primeiro método de produção de biovidro usado foi o de fusão e neste processo os vidros como o 45S5 são fundidos a temperaturas perto dos 1300 °C. Após a sinterização, devido às composições e materiais utilizados, há geralmente uma cristalização do mesmo. Em 1982, estudos realizados por *Hench, Prassas e Phalippou* mostraram que era possível através do processo de sol-gel a baixas temperaturas seguido de processos de secagem e sinterização produzir biovidros. O gel resultante tinha a vantagem de tanto se poder tornar num vidro denso ou ser usado com um material poroso. Publicaram-se vários artigos de seguida com a descrição de processos, estruturas e comportamento químico de biovidros binários (70S30C, 70 mol.% de SiO₂ e 30 mol.% de CaO) e até unicamente à base de sílica contudo, o estudo que veio de certa forma abrir novas portas no campo dos biomateriais foi o publicado por *Rounan Li, Clark e Hench* em 1991 onde ficou provado que era possível produzir através de sol-gel um gel de vidro bioativo estável. Em 2000 produziu-se um vidro bioativo com apenas dois componentes (CaO e SiO₂), conhecido como 70S30, que se comprovou ser tão bioativo como o 45S5 produzido por fusão [11]. Sendo o 45S5 o material de referência, a presente dissertação pretende recriá-lo usando o método de sol-gel.

O processo de sol-gel tem como grandes vantagens a formação de nanopartículas e espumas a baixas temperaturas, a maior homogeneidade e pureza do produto final, maior área superficial específica dos produtos obtidos e também uma grande interliga-

ção dos micro e nanoporos (os vidros processados através de fusão são essencialmente densos), o que aumenta significativamente a bioatividade do vidro [12, 13]. De salientar ainda que, devido ao fato de através do método de sol-gel, ser possível a obtenção de partículas nanoestruturadas, estas possibilitam o uso de temperaturas de sinterização mais baixas devido à sua maior reatividade. Trata-se de um processo essencialmente químico, onde uma solução que contém os precursores necessários sofre sucessivas reações a baixas temperaturas [14]. Tipicamente, como precursor de sílica é usado o tetraetil-ortosilicato (TEOS), de fórmula $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ que reage com água (hidrólise) geralmente sobre condições ácidas ou básicas para formar a solução (sol) contendo nanopartículas. O gel trata-se de uma rede inorgânica húmida de ligações covalentes de sílica que é posteriormente aquecida e seca, formando o biovidro. Outro aspeto interessante no uso do sol-gel trata-se do menor número de componentes essenciais. O processo de sol-gel, devido à grande área superficial dos produtos obtidos, origina vidros com elevadas taxas de dissolução tendo, por defeito, elevada bioatividade associada. Têm sido produzidos vidros via sol-gel com composição próxima do 45S5 (49.15 mol.% SiO_2 , 25.80 mol.% CaO , 23.33 mol.% Na_2O , 1.72 mol.% P_2O_5) [15]. Como precursores de cálcio e de fosfato, são geralmente usados o nitrato de cálcio tetrahidratado e o trietilfosfato (TEP), respetivamente. Na etapa de secagem, os nitratos e outros produtos secundários indesejados são evaporados. A grande desvantagem do processo de sol-gel por sua vez, está relacionado com a dificuldade de se obterem produtos estruturados de elevadas dimensões sem que estes fraturem durante o processo de secagem. A fratura sucede essencialmente devido a duas razões: a grande redução de tamanho que ocorre durante o processo de secagem e a evaporação dos produtos líquidos durante a reação de condensação. O processo de sol-gel é, à partida, uma solução significativamente mais eficaz no processamento de vidros bioativos para aplicação como revestimento de materiais médicos, não necessitando de desempenhar qualquer tipo de função estrutural mas sim unicamente biológica o que é o objetivo dos revestimentos [14, 15].

1.3 Processos de revestimento - CoBlastTM

Embora os métodos de processamento do revestimento sejam variados, o presente trabalho tem como foco o desenvolvimento de revestimentos de vidro bioativo segundo o processo de *CoBlastTM*. Este processo foi desenvolvido pela *EnBIO* em 2011 e é um processo denominado não-térmico, ou seja, funciona à temperatura ambiente. Esta característica vem colmatar um dos problemas associados ao método de processamento mais usado até à data que se trata de um processo térmico de spray assistido por plasma

que usa temperaturas extremamente elevadas (aumentando significativamente os gastos energéticos) e para o qual são necessários equipamentos específicos e instalações apropriadas com um custo associado elevado. Os materiais a serem depositados, neste caso os pós de vidro bioativo, juntamente com pós de material abrasivo, são bombardeados de forma contínua para o substrato através de um *nozzle* [16]. A figura 1 abaixo exposta representa um esquema do equipamento usado em CoBlast™.

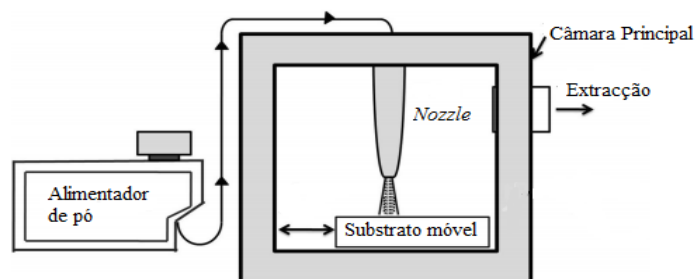


Figura 1.1 – Esquema ilustrativo do processo de CoBlast em modo *single-nozzle* [17].

O pó abrasivo elimina os óxidos à superfície do metal, expondo-o (tornando-o mais reativo), permitindo que as partículas de vidro bioativo adiram ao substrato de forma rápida e coesa antes que se formem camadas de óxido. O pó abrasivo usado tem de ser inerte para que este não estabeleça ligações químicas com o substrato, permitindo um revestimento completo e com elevada taxa de cobertura, sem contaminações. Este processo oferece um nível de integração entre revestimento e substrato superior ao dos processos de revestimento usados geralmente, oferecendo novas e variadas possibilidades. Os principais parâmetros de controlo desta técnica são o tamanho de partícula, o ângulo do *nozzle* e a altura a que estes se encontram do substrato bem como a pressão e direção impostas no bombardeamento das partículas. Posteriormente, os substratos sofrem um processo de limpeza através do uso de jatos de ar de forma a serem removidas as partículas que não aderiram ao substrato [16, 17].

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

Para a produção do vidro bioativo pelo método de sol-gel foi usado tetraetilortossilicado (TEOS, Sigma-Aldrich, 98%) como precursor de sílica, trietilfosfato (TEP, Fluka Analytical) como precursor de fósforo, nitrato de sódio (NaNO_3 , AppliChem Pan-reac) como precursor de sódio e nitrato de cálcio tetra-hidratado ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, Sigma Aldrich, 99%) como precursor de cálcio. Como catalisador da reação foi usado ácido nítrico (HNO_3 , 65%) que foi preparado misturando com água ultrapura de forma a ser obtida uma concentração de 2M.

No processo de revestimento por *CoBlast*TM foram usadas placas de uma liga de Ti-6Al-4V com dimensões de 15mm x 15mm x 1mm. As placas foram revestidas com duas misturas compostas pelo vidro bioativo produzido que apresenta uma densidade de cerca de 0.6 g.cm^{-3} , hidroxiapatite comercial (fornecida pela Altkitin com granulometria entre os $38\mu\text{m}$ e os $56\mu\text{m}$ e com uma densidade de 1.08 gcm^{-3}) e por um abrasivo de alumina com uma densidade de 1.7 g.cm^{-3} .

2.2 Preparação de vidro bioativo através de Sol-Gel

Ao nível da composição do vidro bioativo produzido, o objetivo foi o de replicar as percentagens de SiO_2 , P_2O_5 , Na_2O e CaO presentes no já comercial *Bioglass*[®]. Todo o processo de mistura dos precursores foi efectuado sob agitação mecânica (300 – 400 rpm) e a uma temperatura constante de 35 °C, em banho de silicone (por oferecer melhor homogeneização de temperatura). Inicialmente a solução ácida (52 mL) é colocada num copo de precipitação, que por sua vez é deixado em agitação numa placa de aquecimento segundo os parâmetros previamente descritos. Após a uniformização da solução e uma vez alcançada uma temperatura constante, o TEOS (23.2 mL) e o TEP (2 mL), através de uma ampola de decantação, são adicionados em simultâneo à solução ácida, gota-a-gota. Após a adição destes dois precursores, e aguardando cerca de 45 minutos, é obtida uma solução transparente uniforme. De seguida, são adicionados lenta-

mente os pós de NaNO_3 (9.32 g). Através da agitação permanente e da temperatura do processo, a dissolução dá-se em poucos minutos. São por fim adicionados, sob as mesmas condições, os pós de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (14.30 g). Concluída esta etapa, a solução é mantida sob as mesmas condições de agitação e temperatura e, ao fim de aproximadamente 1 h, obtém-se um gel transparente. O gel resultante sofre uma etapa de secagem, efetuada a 60 °C, durante 12 h. Por fim, procede-se à sua sinterização no forno; numa primeira etapa a 200 °C e numa segunda etapa a 700 °C, durante 5 h e 2 h respetivamente. No término desta etapa, são obtidos aglomerados do vidro bioativo que por sua vez sofrem um processo de desaglomeração para que se possam obter pós finos. Este processo de sol-gel é efetuado várias vezes até se atingir a quantidade desejada (cerca de 300 g).

2.3 Revestimento através de *CoBlast*TM

O processo de revestimento por *CoBlast*TM foi efetuado nas instalações disponibilizadas pela CERAMED. Numa primeira etapa, as placas a revestir sofreram um processo de limpeza sendo colocadas durante 15 minutos a 50 °C numa máquina de ultrassons (VWR Ultrasonic Cleaner USC – TH) imersas num detergente específico anti-corrosivo (Surfaclean 995). Retiradas da limpeza por ultrassons, foram passadas por água corrente e por fim imersas durante 5 minutos em metanol. Após a limpeza, prepararam-se os substratos para a deposição. Os substratos têm forma quadrangular e foram colocadas três filas de fita adesiva de dupla face igualmente espaçadas entre si onde se colocaram as placas a revestir. Em cada fila de fita adesiva foram colocadas cinco placas sequencialmente e ligeiramente espaçadas entre si. Cada substrato foi então preparado com 15 placas de Ti-6Al-4V (imagem c) da figura 2.1) e posteriormente colocado na máquina de revestimento. A máquina usada para revestir era dividida em 3 componentes. Uma primeira área destinada ao revestimento propriamente dito onde são colocados os substratos e que possui um único *nozzle* robotizado que expõe a mistura pretendida (imagem a) da figura 2.1). A esta área são ligados exteriormente os outros dois componentes. Um aspirador que é ligado à zona de revestimento para que possa extrair continuamente o pó desperdiçado durante o processo e a zona onde é colocada a mistura e onde é definida a velocidade de alimentação e a pressão a que é fornecida (imagem b) da figura 2.1). Este último componente (Sulzer Metco Single 10-C Powder Feeder), programado manualmente, contém um recipiente onde é colocada a mistura (600 mL). Este recipiente contém um disco rotativo que recebe a mistura continuamente e a transporta

até ao tubo que liga o recipiente ao *nozzle*. Na figura 2.1 encontra-se o equipamento utilizado no procedimento.

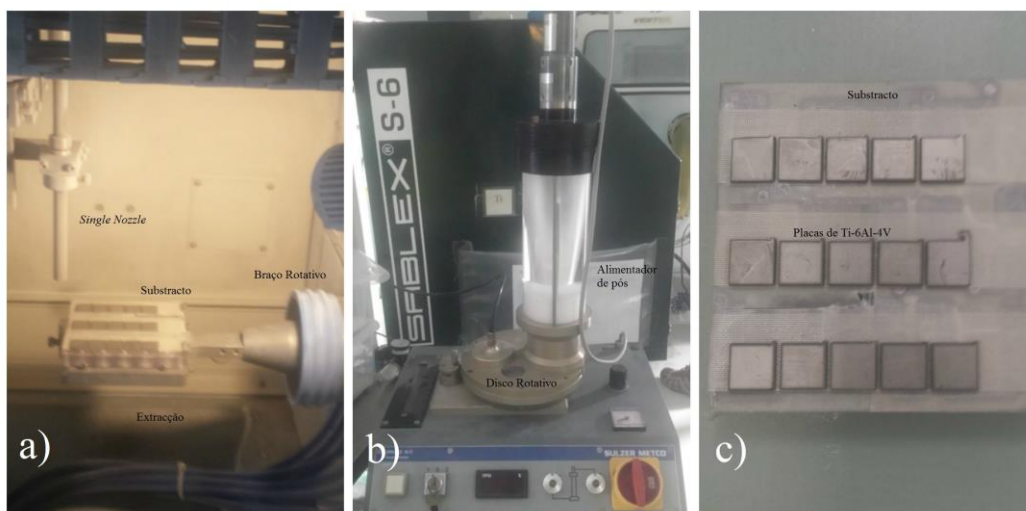


Figura 2.1 – Equipamento utilizado no processo de revestimento por CoBlast™. A imagem a) corresponde à câmara principal onde se dá o revestimento, a imagem b) corresponde à área que contém o recipiente onde é colocada a mistura a depositar e a imagem c) corresponde ao substrato onde são colocadas as placas de Ti-6Al-4V a revestir.

A velocidade de rotação foi colocada em 50 rpm e a pressão a 5.5 bar. O movimento do *nozzle*, sendo robotizado, foi previamente programado no computador incorporado na máquina tendo em conta as posições das placas a revestir no substrato. Por fim foram preparadas as misturas a depositar. Foi usado um rácio de 50/50 (v/v) entre mistura pretendida e pó abrasivo respetivamente. Foram preparadas três misturas que serão apresentadas na tabela seguinte.

Tabela 2-1 – Quantidade de cada componente nas misturas usadas no revestimento.

Mistura	% Abrasivo	% HAp	% Vidro bioativo	Abrasivo (g)	HAp (g)	Vidro bioativo (g)
Controlo (HAp)	50	50	-	510	324	-
Mistura A		40	10		260	36
Mistura B		32.5	17.5		211	63

Após medidas as quantidades, foram introduzidos os ingredientes num misturador em V que é colocado em rotação constante durante 5 minutos. De seguida o pó é retirado do misturador e colocado no recipiente demonstrado na imagem b) da figura 2.1. Cumpri- das estas etapas resta apenas dar início ao processo de revestimento. Para isso, o subs- trato é colocado na máquina e posto em vácuo (carregando na tecla *Vacuum*) e é defini- do no computador o programa preparado previamente. É ligado o aspirador, coloca-se em movimento o disco do recipiente (rodando a chave para a posição 1) à velocidade definida e liga-se a pressão. De seguida carrega-se no botão START e dá-se início ao revestimento. No fim, é limpa a máquina, o suporte e as placas revestidas com jato de ar.

2.4 Caraterização

2.4.1 Espetroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização da estrutura química da amostra (após sinterização) foi estudada recorrendo a análises de FTIR realizadas nas instalações do CENIMAT. Os espectros foram obtidos em modo de absorvância recorrendo a um espectrofotómetro FTIR Thermo Nicolet 6700 à temperatura ambiente (20 °C) e recorrendo a pastilhas de KBr. Os resultados foram medidos num intervalo de número de onda compreendido entre 1800 a 400 cm^{-1} em intervalos de 10 cm^{-1} sendo que cada medida foi efetuada 5 vezes.

2.4.2 DRX

Os ensaios de DRX foram elaborados nas instalações do CENIMAT. A cristali- nidade dos pós de vidro bioativo sinterizados foi analisada recorrendo ao DRX usando radiação monocromática de cobre ($\text{Cu}_{K\alpha}$) com um comprimento de onda $\lambda = 0.15406$ nm. As análises foram registadas em intervalos de 0.033° com 33 segundos de intervalo entre cada registo durante um intervalo de 2 θ compreendido entre os 10° e os 90°. No final, as fases cristalinas foram devidamente identificadas recorrendo ao software *HighScorePlus*.

2.4.3 Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade aos pós produzidos foram feitos no Departamento de Física (DF, FCT/UNL) da faculdade sob orientação do professor Jorge Carvalho Silva.

Os ensaios de citotoxicidade podem ser realizados segundo método direto ou indi- reto. Para os pós de vidro bioativo foi usado o método indireto (método do extrato) com

o recurso a células Vero. Tendo em conta a minuciosidade do procedimento, tiveram de ser cumpridos rigorosos parâmetros de segurança [18]. A amostra de vidro bioativo (122 mg) foi inicialmente suspensa em 2 mL de meio de cultura. Para a obtenção do substrato, a suspensão foi colocada sob agitação numa incubadora durante 24 horas a 37 °C. Para a preparação da sementeira, foram colocados em cada um dos 96 poços da microplaca 100 µL de meio com células [cerca de 25 mil células/cm²). A placa foi de seguida colocada na incubadora a 37 °C com uma atmosfera com 5% de CO₂ durante 24 horas. Posteriormente, retirou-se da incubadora a placa e o meio em contato com a amostra. O meio em contato com a amostra foi então colocado num microtubo (1 mL) e foi retirado o meio das células de cada um dos poços. De notar que a placa usada contém 8 linhas de poços (a primeira corresponde a uma concentração C₀ ou seja, uma concentração mais alta de vidro bioativo, a segunda C₀/2, correspondendo a uma dissolução para metade e assim sucessivamente até C₀/128). Cada concentração foi replicada 5 vezes. Na mesma placa foi também realizado o controlo positivo (C+) onde foram adicionados 10 µL de DMSO, composto extremamente citotóxico, e no controlo negativo (C-) não se realizou qualquer alteração do meio. Colocou-se por fim a placa de novo na incubadora durante 48 horas. Para a análise da viabilidade celular foi usada a resazurina. Após as 48 horas na incubadora, a placa foi retirada e o meio contido em cada poço foi também removido. De seguida foi colocado em cada poço uma solução de 90% de meio completo e 10% de resazurina. A análise da viabilidade consiste numa mudança de coloração da solução (caso hajam células vivas a solução torna-se rosa, caso contrário fica azul). A placa foi então colocada na incubadora durante 4 horas. Após esse período, mediram-se as absorvâncias de cada poço (a 570 nm e a 600 nm) num leitor de microplacas Biotek ELX800.

Para os cálculos da viabilidade celular, controlo de meio e incertezas foram inicialmente feitas as médias das 5 réplicas para cada poço e foram usadas as seguintes expressões:

$$\text{Controlo Meio} = "Média_i" - "Média CM" \quad \text{Equação 2.1}$$

$$\text{Viabilidade celular} = \frac{"Controlo Meio_i"}{("Média C-" - "Média CM")} \quad \text{Equação 2.2}$$

$$\text{Incerteza} = \sqrt{\sigma^2 + \sigma_{CM}^2} \quad \text{Equação 2.3}$$

onde σ representa o desvio padrão para cada uma das concentrações usadas e σ_{CM} o desvio padrão do controlo do meio. Para analisar a viabilidade celular há que ter em conta quatro denominações consoante a percentagem de viabilidade que se obtém e são

elas: viabilidade superior a 90% o material é não citotóxico; com viabilidade celular entre os 80% e 89% considera-se levemente citotóxico; entre os 50 % e 79 % é moderadamente citotóxico; caso seja inferior a 50 % é severamente citotóxico [18].

2.4.4 SEM e EDS

As análises de SEM e EDS, que nos permitem observar a estrutura externa dos revestimentos bem como a sua composição elementar, foram realizadas nas instalações do CENIMAT recorrendo a um Microscópio Electrónico de Varrimento ZEISS, modelo DSM 962. Numa primeira fase foram colocadas 3 placas de Ti-6Al-4V revestidas (uma com HAp, outra com a mistura A (20% de vidro bioactivo e 80% de HAp) e outra com a mistura B (35% de vidro bioactivo e 65% de HAp)), referidas no sub-capítulo 2.3, páginas 7,8 e 9) e uma placa de Ti-6Al-4V sem revestimento, num suporte apropriado para SEM. As amostras foram coladas ao suporte com fita de carbono para melhorar a condutividade eléctrica das mesmas. Antes de colocar o suporte no SEM, este foi colocado numa máquina de *sputtering* (AGAR Sputter Coater) para que se depositasse uma fina camada de ouro com o objetivo de melhorar ainda mais a condutividade eléctrica. Foi posteriormente colocado o suporte no compartimento do SEM e iniciou-se o vácuo no mesmo. Foram tiradas imagens de cada uma das amostras com uma resolução de 200x, 1000x e nas revestidas com HAp e vidro bioativo também a 3000x, com um feixe de electrões a 5 kV. A análise de EDS (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) foi feita com recurso aos instrumentos de SEM e recorrendo de seguida ao *software* INCA, retirando-se os respectivos espectros de zonas consideradas importantes.

2.4.5 Adesão (Citotoxicidade) e Proliferação Celular

Os ensaios de adesão e proliferação celular às placas revestidas por CoBlast™ foram feitos no Departamento de Física (DF, FCT/UNL) da faculdade sob orientação do professor Jorge Carvalho Silva.

Os parâmetros de segurança considerados nos ensaios de citotoxicidade foram também aqui seguidos [18]. Para estes ensaios foram usados osteoblastos. Foram colocadas 2 placas de cada uma das 4 amostras (i) (Ti sem revestimento, revestido com HAp, revestido com a mistura A (20% de vidro bioativo e 80% de HAp) e revestido com a mistura B (35% de vidro bioativo e 65% de HAp)) em caixas de Petri. De notar que o índice (i) corresponde a cada uma das amostras referidas anteriormente de forma a simplificar as expressões abaixo descritas. Seguidamente foi colocado etanol de forma a

cobrir as placas na totalidade para esterilização. Após cerca de 5 minutos o etanol foi aspirado e as placas deixadas a secar.

Para preparação das células foi retirado o meio e procedeu-se à sua lavagem com PBS e depois com tripsina. Após contagem das células foram colocados 4 mL de meio com células em cada uma das caixas de Petri. As placas sofreram posteriormente uma incubação a 37 °C com uma atmosfera com 5% de CO₂ durante 48 horas. Após as 48 horas (1º dia) foi retirado o meio e foi colocada a solução com resazurina (10% de resazurina e 90% de meio). Nesta etapa, as placas foram postas em novas caixas de Petri e de seguida foi colocada a solução de resazurina. Esta solução foi também colocada nas caixas de onde se retiraram as placas para avaliar o comportamento das células que aderiram ao plástico (Células na caixa). Estas células aderidas à caixa foram apenas estudadas no primeiro dia para efeitos de cálculo da taxa de adesão. Após 4 horas, usando duas microplacas de 96 poços, foram colocadas 8 réplicas de 200 µL de cada caixa com amostras, e 8 réplicas de 200 µL de cada caixa sem as amostras. As microplacas foram então colocadas num leitor apropriado Biotek ELX800 e foram lidas as absorvâncias de cada poço (a 570 nm e a 600 nm). Foi colocado PBS nas caixas de Petri para lavagem e, após remoção do mesmo, foi de novo colocado meio em cada uma dessas caixas de Petri (excetuando nas que não continham placas) e aguardaram-se 2 dias. Após os 2 (3º dia), 4 (5º dia), 6 (7º dia) e 8 (9º dia) dias repetiu-se o processo anterior mas apenas nas caixas que contém as amostras. Obtemos assim um total de 9 dias de ensaios, onde o primeiro serve para cálculo da adesão das células às placas (contendo também os resultados das células aderidas às caixas de Petri de onde se calcula a taxa de adesão, fazendo uma contagem de células aderidas ao revestimento e uma de células aderidas às caixas) e os restantes para cálculo da proliferação. Para cada um dos 5 dias foram feitas as subtrações entre as duas absorvâncias medidas para cada réplica. A cada um desses resultados foi subtraído o valor da média do controlo de meio efetuado e foram de seguida feitas as médias e respetivos desvios padrão desses valores para cada amostra (i), em cada um dos dias. A partir dessas médias foram então realizados todos os restantes cálculos seguindo as seguintes expressões:

$$T. \text{ adesão relat. CC (i)} = \frac{Média_{amostra (i)}}{Média_{CC} - Média_{células na caixa(i)}} \quad \text{Equação 2.4}$$

$$T. \text{ adesão relat. Ti (i)} = \frac{Taxa \text{ de adesão relativa a CC (i)}}{Taxa \text{ de adesão relativa a CC do Ti}} \quad \text{Equação 2.5}$$

$$T. \text{ de Prolif. (i)} = \frac{Média \text{ de cada amostra (i) em cada dia}}{Média \text{ da amostra (i) do primeiro dia}} * T. \text{ adesão relat. Ti (i)} \quad \text{Equação 2.6}$$

A incerteza relativa correspondente à equação 2.4 foi calculada segundo a seguinte expressão:

$$Incerteza_{CC(i)} = \sqrt{\left(\frac{Desvio_{(i)}^2}{Média_{(i)}^2}\right) + \frac{Desvio_{CC}^2 + Desvio_{Células na placa (i)}^2}{(Média_{CC} + Média_{Células na placa (i)})^2}} \quad \text{Equação 2.7}$$

A incerteza relativa respetiva à equação 2.5 foi calculada segundo a seguinte expressão:

$$Incerteza_{Ti(i)} = \sqrt{\frac{Incerteza_{CC(i)}^2}{T.adesão\ relat. CC_{(i)}^2} + \frac{Incerteza_{CC(Ti)}^2}{T.adesão\ relat. CC_{(Ti)}^2}} \quad \text{Equação 2.8}$$

A incerteza relativa respetiva à equação 2.6 foi calculada segundo a seguinte expressão:

$$Incerteza(i) = \sqrt{\left(\frac{Desvio (i)_{nesse dia}}{Média (i)_{nesse dia}}\right)^2 + \left(\frac{Desvio (i)_{1ª dia}}{Média (i)_{1ª dia}}\right)^2 + \left(\frac{Incerteza_{Ti(i)}}{T.adesão\ relat. a Ti (i)}\right)^2}$$

Equação 2.9

3 Análise e Discussão de Resultados

Neste capítulo serão expostos e discutidos os resultados obtidos nos vários testes efetuados tanto no pó de vidro bioativo como nas placas de Ti-6Al-4V revestidas. A ordem pela qual serão debatidos está disposta com uma primeira fase de análises (DRX, FTIR e citotoxicidade) realizadas ao pó produzido na perspectiva de averiguar se este reúne as condições necessárias para que possa ser usado como material de deposição. Numa fase posterior recorrendo a DRX, SEM, bioatividade e proliferação celular serão então analisados os resultados dos testes realizados às placas revestidas.

3.1 Estrutura química do vidro bioativo (FTIR)

As medidas resultantes da análise de FTIR, comparando com a literatura, têm como objetivo identificar a estrutura química e os grupos funcionais presentes nos pós de vidro bioativo sinterizado produzidos em laboratório. Na figura seguinte encontra-se exposto o espectro resultante (figura 3.1).

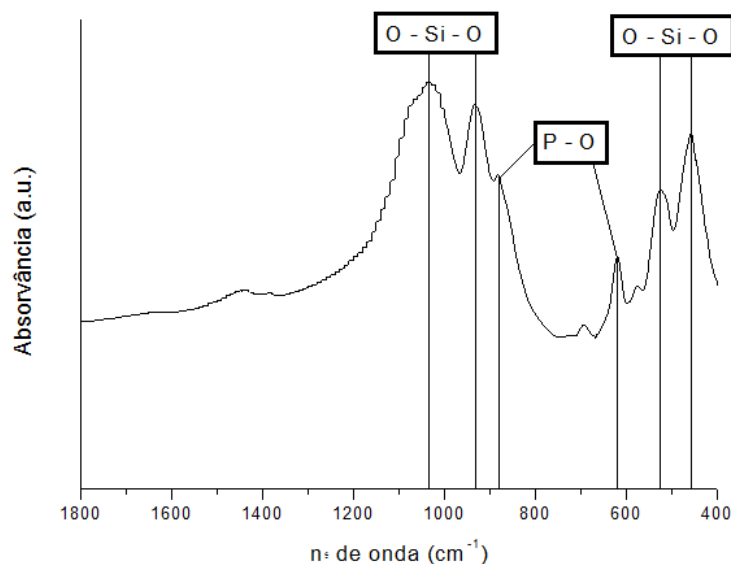


Figura 3.1 – Espectro do ensaio de FTIR em modo de absorvância do vidro bioativo

Os dois picos a 1033 cm^{-1} e 931 cm^{-1} são característicos das bandas de absorção de silicatos. O primeiro deve-se às vibrações de deformação axial assimétrica dos átomos de oxigénio presentes no interior do tetraedro formado pelos grupos SiO_4 . O segundo pico por sua vez, está relacionado com as vibrações de deformação axial de Si-O-Si dos átomos de oxigénio ditos soltos ou seja, os que se encontram fora do tetraedro dos grupos SiO_4 . [19; 20; 21; 22].

Aos 883 cm^{-1} aparece um pico que poderá estar de certa forma disfarçado no pico de 931 cm^{-1} . Este é atribuído às vibrações de deformação angular de P-O dos grupos PO_4^{3-} . Também o pico presente nos 617 cm^{-1} é atribuído às vibrações de deformação angular de P-O. Este pico merece uma especial atenção pois é correlacionado com uma fase cristalina $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ característica dos vidros bioativos produzidos por sol-gel, estando relacionada com a *HCA* [13; 19; 20; 21; 22].

Por fim, os últimos dois picos assinalados a 526 cm^{-1} e 457 cm^{-1} correspondem a vibrações de deformação angular assimétrica de Si-O-Si.

O espectro obtido vai de encontro ao que é publicado em relação ao já comercial 45S5 ou Bioglass[®] produzido através do método de sol-gel. Quando comparado aos biovidros produzidos através do método de fusão, que são amorfos, o produto produzido em laboratório apresenta uma cristalização parcial que, contudo, não põe em causa as propriedades pretendidas do material (biocompatibilidade e bioatividade).

3.2 Análise cristalográfica dos pós de vidro bioativo (DRX)

Na figura 3.2 está exposto a preto um difratograma dos pós de vidro bioativo sem qualquer tipo de sinterização, apenas com a etapa de 12 horas de secagem e a azul o difratograma dos pós já sinterizados. O já comercial Bioglass[®] é caracterizado por ser totalmente amorfo.

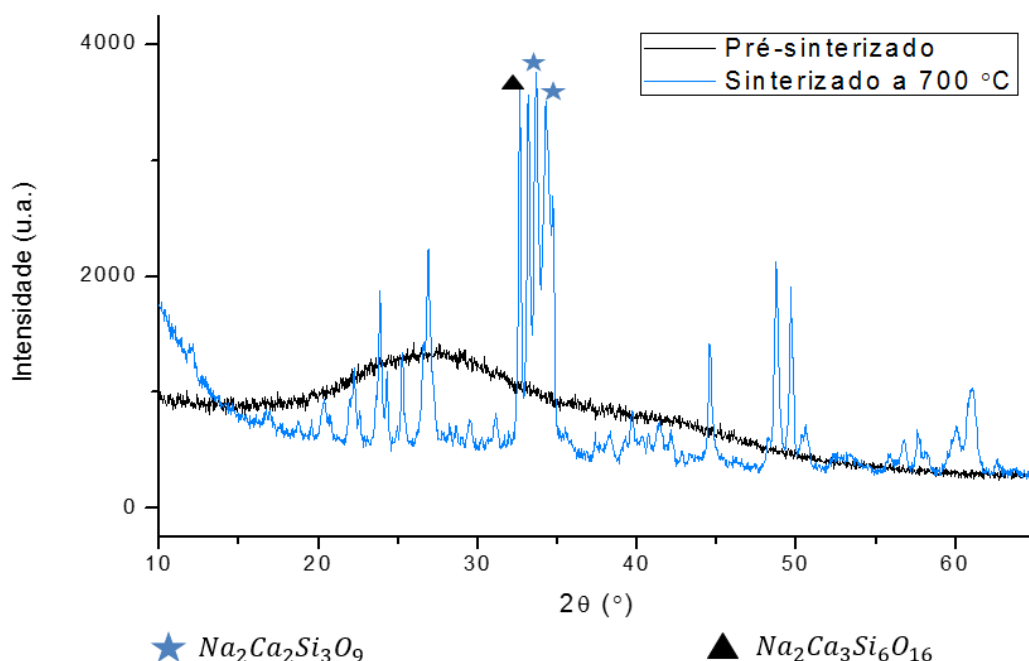


Figura 3.2 – Difratomogramas obtidos por DRX da amostra não sinterizado (preto) e com sinterização completa (azul)

Analisando os gráficos da figura 3.2 podemos desde logo constatar que, antes da etapa de sinterização, o material produzido (curva a negro) comporta-se como um vidro à base de sílica com a curva característica de um material amorfo. Contudo, após sinterizado (curva azul), o material adquire fases cristalinas. São visíveis vários picos cristalinicos no espectro tirado e, tendo em conta este fenómeno, assume-se que esta cristalização parcial dos pós produzidos está relacionada com a etapa de sinterização a 700 °C. De facto, nesta altura será mais correto considerar o material produzido como um vitro-cerâmico e não como um vidro [23]. Das fases cristalina presentes, a que se destaca, sendo a fase cristalina primária do pó, é a combeite, $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$ (JCPDS #22-1455). Ainda que anteriormente tenha sido referido que o 45S5 é um material amorfo (mas produzido pelo método de fusão), vários estudos relacionados com a replicação deste material através do método de sol-gel comprovam a formação da fase combeite [13; 19; 24; 25; 26]. Esta fase cristalina é conhecida por ter influência nas propriedades mecânicas do material e também na sua bioatividade. Isto porque, sendo uma fase cristalina, mais densa do que um material amorfo, torna o material em questão mais resistente mecanicamente, oferecendo melhores propriedades mecânicas. Contudo, sendo mais denso, torna-se à partida menos biodegradável podendo mesmo, num caso extremo, tornar-se um material bioinerte [26, 27].

Uma segunda fase cristalina, sendo a fase secundária, que aparece no espectro do material produzido tem a fórmula $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$ (JCPDS #23-0671). Esta fase é também comum aparecer nos vidros bioativos produzidos por sol-gel e com temperaturas de sinterização acima de 600 °C contudo, não tem influência na bioatividade do material [28].

Após a análise de DRX, ainda que o material não deva ser considerado um vidro mas sim um vitro-cerâmico, continua de acordo com estudos realizados no processamento deste tipo de produto através do método de sol-gel pelo que será de esperar que os ensaios citotóxicos não exponham qualquer tipo de contrariedade e que o material possa então ser usado como revestimento.

3.3 Análise citotóxica dos pós de vidro bioativo

A análise citotóxica dos pós produzidos tem como objetivo perceber se o material promove ou não o crescimento celular o que, neste caso, determinará se o material pode ou não ser usado como revestimento e, por conseguinte, posto em contato com o organismo. Na tabela 3.1 estão expostos os resultados obtidos com o respetivo cálculo da viabilidade celular e suas incertezas. C_0 corresponde a uma totalidade de vidro bioativo, $C_0/2$ a uma redução para metade e assim sucessivamente. Foram feitas as médias, para cada concentração, das diferenças dos valores de absorvância medidos.

Tabela 3.1 – Resultados dos ensaios de citotoxicidade ao pó de vidro bioativo.

Concentrações (m/v)	Média	Controlo Meio	Viabilidade Relativa (%)	Desvio Padrão	Incerteza
C_0	-0.2450	0.0235	3.4194	0.0228	0.0325
$C_0/2$	-0.2450	0.0235	3.4194	0.0079	0.0245
$C_0/4$	0.3724	0.6409	93.2557	0.0571	0.0616
$C_0/8$	0.4310	0.6995	100	0.0602	0.0645
$C_0/16$	0.4116	0.6801	98.9596	0.0319	0.0395

C ₀ /32	0.3900	0.6585	95.8167	0.0727	0.0763
C ₀ /64	0.4226	0.6911	100	0.0201	0.0307
C ₀ /128	0.4192	0.6877	100	0.0192	0.0301
C+	-0.2265	0.0420	6.1111	0.0480	0.0533
C-	0.4187	0.6873	100	0.0066	0.0241
CM	-0.2685	-	-	0.0232	-

Analisando os resultados, pode-se constatar desde logo que para C₀ e para C₀/2 certamente o material é severamente citotóxico ou seja, não promove o crescimento celular, levando à morte da totalidade das células. Contudo, a partir de C₀/4, inclusive, o material passa de severamente citotóxico para não citotóxico. Para concentrações superiores a C₀/4 mas inferiores a C₀/2 não se podem tirar conclusões fundamentadas podendo o material neste intervalo de concentração encontrar-se entre o moderadamente citotóxico e o levemente citotóxico. As duas situações onde o material é considerado severamente citotóxico podem ser justificadas tendo em conta que, aquando realizada uma medição de pH, para altas concentrações de vidro bioativo, o valor aproximava-se dos 11. Sendo assim, para além de para altas concentrações o pH ser demasiado básico, devido à grande concentração de vidro bioativo e sendo este biodegradável, a taxa de dissolução pode ter sido demasiado rápida tornando-se nocivo para as células. Para concentrações de pós mais baixas, o pH já não é tão básico e, estando mais dissolvido, as reações que promovem a sua degradação são também mais lentas. Contudo, apesar da citotoxicidade observada para as duas concentrações mais elevadas, o material continua a apresentar características propícias para o seu uso como revestimento. Isto porque, de acordo com o pretendido em termos de mistura, o revestimento nunca irá ter as duas concentrações mais elevadas pois será misturado com hidroxiapatite nas proporções descritas a cima pelo que, à partida, o material revestido não terá qualquer tipo de problemas em termos citotóxicos (a concentração de vidro bioativo será sempre inferior a C₀/2).

3.4 Análise Estrutural e Composição Elementar das placas revestidas (SEM e EDS)

Para avaliar a qualidade dos revestimentos a nível estrutural bem como a composição dos mesmos, analisaram-se as placas com recurso a SEM e EDS. De forma a haver um meio de comparação, além das placas revestidas com as misturas A (20% de vidro bioativo e 80% de HAp) e B (35% de vidro bioativo e 65% de HAp), foram também analisadas placas sem qualquer revestimento e placas revestidas com HAp comercial. De seguida serão expostas e discutidas as imagens de SEM para cada uma das amostras. Os resultados de EDS serão discutidos neste mesmo capítulo contudo e serão expostos os espectros retirados em toda a área da imagem. Os espectros referentes a zonas pontuais das imagens de SEM encontram-se expostos no anexo 6.1.

A figura 3.3 corresponde às imagens de SEM das placas de Ti-6Al-4V sem revestimento. Tanto na imagem A1 como na A2 podemos observar uma uniformidade da amostra excetuando ligeiras falhas correspondentes a marcas de corte. Estas amostras não foram analisadas a nível de EDS pois não sofreram qualquer tipo de alteração desde a sua aquisição pelo que a sua composição irá de encontra ao estipulado pela empresa.

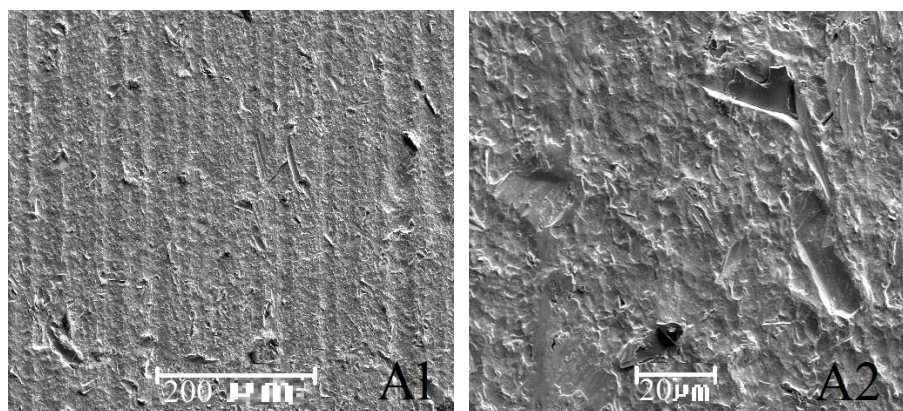


Figura 3.3 – Imagens retiradas através de SEM representativas da placa de Ti-6Al-4V sem revestimento. A1 com ampliação de 200x; A2 com ampliação de 1000x.

Na figura 3.4 podemos observar 3 imagens com diferentes ampliações de uma placa de Ti-6Al-4V revestida com HAp comercial. Tendo em conta que a HAp é o material mais usado em revestimentos na área de biomateriais, a sua análise é de extrema importância, servindo como método comparativo, permitindo avaliar a viabilidade do vidro bioativo como um revestimento.

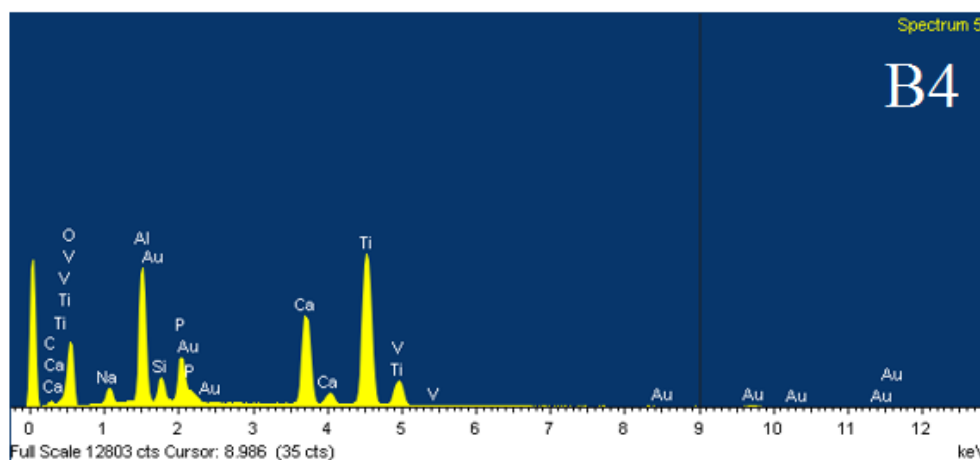
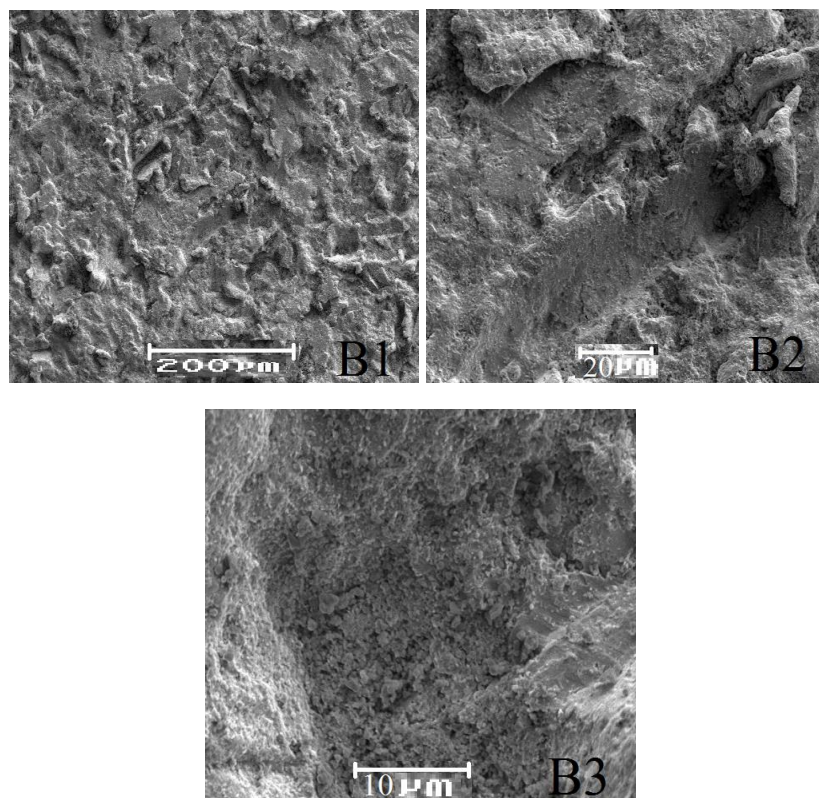


Figura 3.4 - Imagens retiradas através de SEM representativas da placa de Ti-6Al-4V revestidas com HAp comercial. B1 com ampliação de 200x; B2 com ampliação de 1000x; B3 com ampliação de 3000x; B4 corresponde ao espectro retirado por EDS em toda a área desta amostra.

A imagem B1, sendo a menos ampliada, permite ter uma visão mais abrangente do revestimento. Pode-se observar uma boa cobertura do substrato, sem evidências de fraturas e falhas. Embora de certa forma contínua, é possível visualizar alguma rugosidade no revestimento, havendo alguns grãos expostos. Para uma melhor análise obteve-se um espectro de EDS. O espectro foi retirado em toda a área da imagem selecionada visto ser

um revestimento unicamente de HAp (imagem B4 da figura 3.4). É possível comprovar a presença maioritária de HAp devido aos picos de maior intensidade de Ca, P e O. Os picos de Al, V e Ti correspondem ao substrato e ao pó abrasivo usado e os ligeiros picos de Au são do revestimento por *sputtering*.

A figura 3.5 apresenta 3 imagens de SEM da amostra revestida com a mistura A (20% de vidro bioativo e 80% de HAp) em 3 resoluções diferentes. Desde logo, com recurso à imagem C1, em modo de comparação com a amostra revestida com HAp comercial, é visível uma ligeira redução da rugosidade do revestimento.

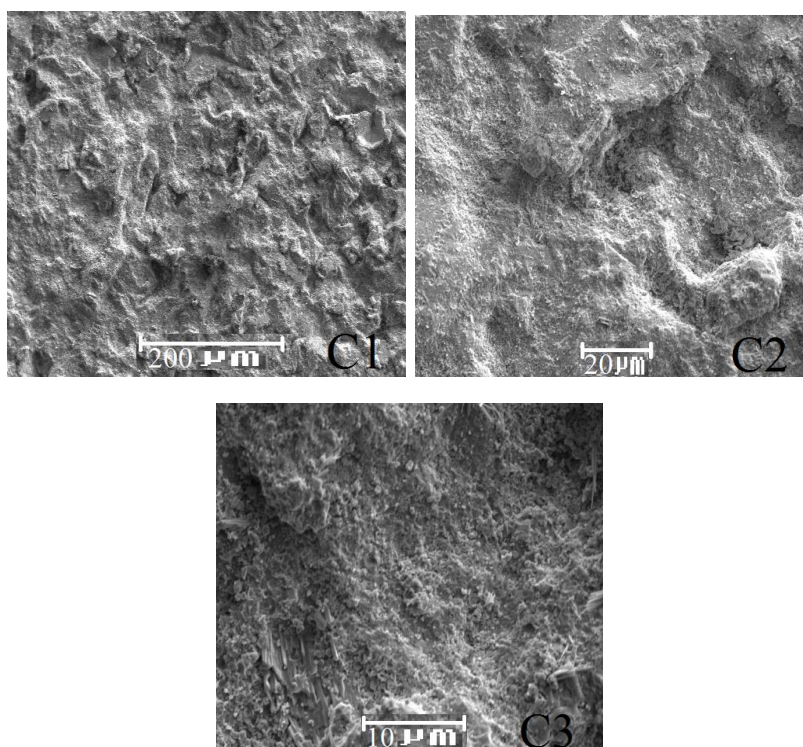


Figura 3.5 - Imagens retiradas através de SEM representativas da placa de Ti-6Al-4V revestidas com a mistura A. C1 com ampliação de 200x; C2 com ampliação de 1000x; C3 com ampliação de 3000x.

Trata-se efetivamente apenas de uma ligeira diminuição, verificando-se uma boa homogeneidade e continuidade do revestimento ao longo de toda a superfície. Observa-se em toda a área de C1 diversos grânulos de reduzida dimensão. Analisando a imagem C2 é notória a redução de rugosidade do revestimento quando comparada com a amostra anterior, apresentando-se uma superfície contínua, sem sinais de fraturas. A imagem C3 evidencia a existência de diversas estruturas em forma de agulha.

A figura 3.6 corresponde às imagens de SEM dos revestimentos feitos com a mistura B (35% de vidro bioativo e 65% de HAp). Comparativamente com as 2 amostras

anteriores (figura 3.4 e 3.5), a imagem D1 demonstra mais uma vez uma redução da rugosidade do revestimento apresentando-se uma cobertura bastante uniforme e contínua ao longo de toda a superfície.

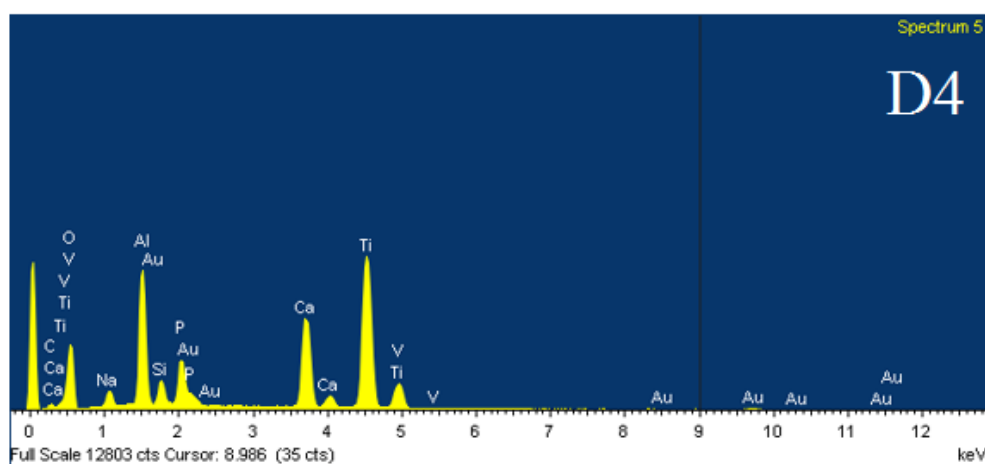
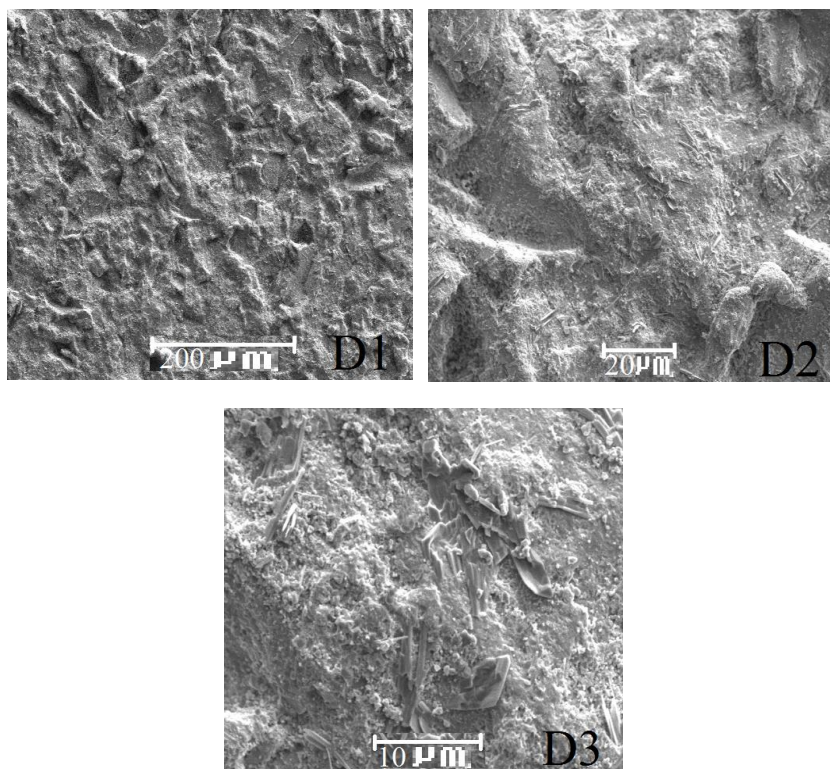


Figura 3.6 - Imagens retiradas através de SEM representativas da placa de Ti-6Al-4V revestida com a mistura B. D1 com ampliação de 200x; D2 com ampliação de 1000x; D3 com ampliação de 3000x; D4 trata-se do espectro retirado por EDS de toda a área da amostra.

Tal como nos casos anteriores há uma ausência de falhas e fraturas. Com maior resolução, a imagem D2 demonstra a homogeneidade do revestimento apresentando contudo uma maior quantidade das estruturas em forma de agulha já visíveis na amostra

anterior (figura 3.5). A imagem D3 permite observar de forma mais pormenorizada a presença dessas mesmas estruturas. De forma a analisar a composição do revestimento, foi feita uma análise EDS a esta amostra (imagem D4 da figura 3.6).

As imagens para análise de EDS foram retiradas no modo BSE (contraste dos elementos é feito de acordo com a sua massa atômica). Na imagem 6.2 do anexo 6.1, foi retirado o espectro da zona 1. A análise de EDS feita nesta imagem teve como principal razão o estudo da composição do bastonete da zona 1 que se esperava ser uma forma cristalina do vidro bioativo. Analisando o mesmo, constata-se que o bastonete visível tem uma predominância de Al (pico com maior intensidade) provenientes ou do pó abrasivo utilizado no processo de revestimento ou do próprio substrato. Quanto à imagem 6.3 do anexo 6.1, agora analisando o espectro da zona 2, tendo em conta que foi usado o modo BSE, por ser uma zona mais clara da imagem, é possível afirmar que se trata de uma zona com elementos de maior massa atômica. Este pressuposto é confirmado pelo espectro onde se vê um pico mais intenso de Ti. Além desse, observamos picos de Ca, P, Na e Si o que demonstra que esta zona possui também vidro bioativo. O pico de O existente demonstra a presença de HAp querendo isto dizer que é uma zona onde o vidro bioativo e a HAp se encontram misturadas. O espectro da zona 3 (figura 6.4) apesar de ser uma zona mais escura, observa-se uma maior concentração de HAp devido aos picos mais intensos de Ca, P e O. Existem ligeiros picos de Na e Si, correspondendo a uma presença de vidro bioativo também. O espectro retirado em toda a área da amostra (imagem D4 da figura 3.6) permite observar claramente a presença tanto de HAp como de vidro bioativo o que significa que o revestimento foi bem efetuado. De forma a perceber melhor a composição da amostra foi analisada outra zona do substrato.

No anexo 6.1 encontram-se expostos os ensaios realizados. Na imagem 6.7 foi retirado o espectro da zona 1. Foi retirado o espectro pontual (ainda que devido à alta resolução da imagem englobe ligeiramente a zona circundante) numa zona em forma de agulha. Embora sejam visíveis picos de Ca, P, Si, Na e O, o pico que é significativamente mais intenso corresponde a Ti proveniente do substrato. Quanto ao espectro seguinte (figura 6.8), este, foi retirado numa zona onde são visíveis estruturas em forma de agulha, estruturas essas que são visíveis ao longo da amostra. O espectro revela picos mais intensos de Ca, P, O, Si e Na. A zona 3 (figura 6.9) apresenta um pico extremamente intenso de Ti referente ao substrato. Sendo esta uma zona mais escura (as zonas ricas em Ti tendem a ser claras devido à maior massa atômica) esta pode ser uma zona com presença de HAp e vidro bioativo mas com uma espessura reduzida, permitindo que os elétrons passem facilmente até atingirem o substrato, originando um pico mais intenso de Ti. Tendo em conta a dificuldade em retirar conclusões irrefutáveis nos espectros analisados até agora, foi feito um mapeamento em toda a área da amostra (figura

6.10 do anexo 6.1)). Em relação à estrutura da zona 1, através do mapeamento (zonas claras) pode-se observar que esta é formada por Na e O essencialmente. Num panorama geral, é visível uma elevada concentração de Ca, P, Si, Na e O ao longo de toda a área o que permite concluir que houve uma boa cobertura do revestimento com a mistura pretendida. Existem também zonas com Al, Ti e V correspondentes a vestígios do substrato e do abrasivo utilizado.

3.5 Análise da adesão celular às placas revestidas

Para avaliar o comportamento das amostras revestidas em meio biológico foram realizados ensaios de adesão celular, que demonstram se o revestimento é ou não biocompatível e também ensaios de proliferação celular para avaliar se ao longo do tempo as células (osteoblastos) são capazes de se reproduzir tendo em conta as reações que ocorrem entre o meio e o revestimento.

Em termos de adesão celular, foi calculada a taxa de adesão em relação ao revestimento de Ti (equação 2.3, página 13) para cada uma das 4 amostras (sem revestimento, revestida com HAp, revestida com a mistura A (20% de vidro bioativo e 80% de HAp) e revestida com a amostra B (35% de vidro bioativo e 65% de HAp)). Isto porque inicialmente a ideia partia por calcular a taxa de adesão em relação à cultura celular (CC) contudo, os valores obtidos foram de certa forma irreais.

Na tabela 3.2 encontram-se expostos os valores da taxa de adesão e respetivas incertezas.

Tabela 3.2 – Taxa de adesão relativa ao revestimento de Ti das 4 amostras analisadas e respetivas incertezas.

Amostras (i)	Taxa de adesão relativa a Ti	Incerteza
Mistura A	1.17	0.10
Mistura B	1.22	0.10
HAp	0.89	0.09
Ti	1.00	0.11

Analisando os valores da tabela 3.2, começando pelo valor referente ao Ti, sendo 1.00, é justificado por ser um valor que serve como base ou seja, as outras amostras compreendem valores maiores ou menores a este, querendo dizer que houve uma maior ou menor adesão (mais ou menos células que aderiram ao substrato) ao revestimento. A

HAp apresenta uma taxa de adesão de 0.89, o que demonstra que, quando comparada com as placas de Ti-6Al-4V sem revestimento, há menos 11% de células aderidas. Isto demonstra que o revestimento de HAp não tem tanta afinidade para atrair células. Em relação às misturas A (20% de vidro bioativo e 80% de HAp) e B (35% de vidro bioativo e 65% de HAp) observa-se desde logo que ambas apresentam valores superiores a 1.00. Quer isto dizer que quando comparadas com o Ti-6Al-4V, o revestimento com a mistura A apresenta um número de células aderidas 17% maior e o revestimento com a mistura B um número de células aderidas 22% maior. Sendo assim, das 4 amostras analisadas, as revestidas com a mistura A e B são as que apresentam um maior número de células aderidas, sendo desta forma mais propícias a estabelecer reações benéficas com o meio biológico que atraem as células, sendo desta forma mais bioativas do que as restantes amostras.

Na tabela 3.3 estão expostos os resultados dos ensaios de proliferação celular. Estes foram calculados tendo em conta o crescimento do número de células em relação ao 1º dia de ensaio, daí o valor de 1.00 para todas as amostras nesse mesmo dia.

Tabela 3.3 – Valores das taxas de proliferação celular para cada amostra ao longo dos 5 dias de ensaios e relativas incertezas.

Dias	Amostras (i)	Taxa de Proliferação	Incerteza
1º	Mistura A	1.00	-
	Mistura B	1.00	-
	HAp	1.00	-
	Ti	1.00	-
3º	Mistura A	1.34	0.15
	Mistura B	1.08	0.10
	HAp	1.29	0.17
	Ti	1.58	0.24
5º	Mistura A	2.20	0.25
	Mistura B	1.81	0.16
	HAp	2.11	0.27
	Ti	3.11	0.46
7º	Mistura A	2.81	0.40
	Mistura B	2.23	0.22
	HAp	2.75	0.34
	Ti	3.68	0.54
9º	Mistura A	3.03	0.44
	Mistura B	2.49	0.26
	HAp	3.03	0.38
	Ti	3.76	0.47

Embora a mistura com maior concentração de vidro bioativo (mistura B) tenha apresentado uma melhor taxa de adesão, em termos de proliferação, é a mistura com menor concentração (mistura A) que apresenta melhores resultados. O fato de a mistura B não apresentar taxas de proliferação tão boas pode estar relacionado com a primeira etapa de formação de *HCA* à superfície do revestimento. A formação deste composto começa com uma troca iônica de Na^+ e/ou Ca^{2+} do revestimento com íons H^+ existentes na solução, formando silanol. Este composto aumenta o pH do meio e, tendo em conta que esta mistura contém a maior concentração de vidro bioativo comparando com as outras, terá havido um maior aumento de pH, não permitindo uma reprodução celular tão boa. Nos restantes dias, esta amostra demonstra um crescimento do número de células positivo, chegando a atingir no fim do 9º dia um aumento do número de células de 149% quando comparado com o 1º dia. Em termos de resultado final, a mistura A é a que apresenta melhores resultados a par com o revestimento de HAp (203%). Os revestimentos feitos com a mistura A são os que apresentam maiores taxas de proliferação ao longo dos 9 dias de ensaios, sendo apenas igualada pelo revestimento de HAp no último dia. A imagem 3.7 demonstra estes mesmos resultados através de um gráfico de barras onde podemos ver essa mesma proliferação das células ao longo dos dias.

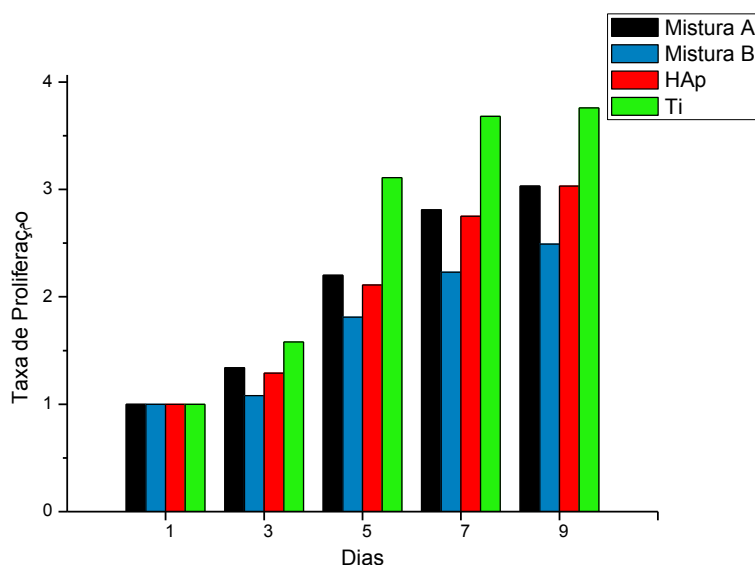


Figura 3.7 – Gráfico de barras da proliferação celular das 4 amostras analisadas ao longo dos 5 dias de ensaios.

Deste modo constata-se que as amostras analisadas são bioativas e biocompatíveis promovendo reações com o meio biológico que promovem o crescimento celular. Em especial as amostras que contêm vidro bioativo, nomeadamente a mistura A, que apre-

seja valores bastante satisfatórios, demonstrando que houve formação de *HCA* que atrai proteínas que são adsorvidas à superfície e desse modo atraem as células osteogênicas.

4 Conclusões e Perspetivas Futuras

A presente dissertação teve como objetivo o desenvolvimento de revestimentos de vidro bioativo recorrendo ao processo de CoBlast™. Esta pode ser dividida em 2 metas. Numa primeira fase era pretendido avaliar a viabilidade da produção de pós de vidro bioativo produzidos pelo método de sol-gel em comparação com método mais comum, a fusão. Uma segunda meta passava pelo estudo do processo de CoBlast™ como técnica de revestimento em detrimento da técnica de processo térmico de spray assistido por plasma. Para o estudo do método de sol-gel foi produzido um vidro bioativo que foi estudado com bastante pormenor, o 45S5, usando como precursores de Si, P, Na e Ca o TEOS, TEP, nitrato de sódio e nitrato de cálcio tetra hidratado respetivamente.

Após produção dos pós de vidro bioativo, estes foram sujeitos a análises de FTIR, DRX e citotoxicidade por forma a analisar a sua viabilidade como materiais de revestimentos em meio biológico.

Os resultados de FTIR foram coerentes quando comparados com a literatura, havendo evidências da presença de grupos O-Si-O e P-O, grupos esses que são característicos dos vidros bioativos. Nos resultados de FTIR contudo, no pico presente nos 617 cm^{-1} , há sinais de uma cristalização parcial. Foi então feita análise de DRX à amostra para melhor entender este fenómeno. Os difratogramas obtidos por DRX vieram comprovar a existência de fases cristalinas, das quais se destaca a combeíte, $\text{Na}_2\text{Ca}_2\text{Si}_3\text{O}_9$, considerada como fase primária. A presença de fases cristalinas vem aumentar a resistência mecânica do material produzido e, a combeíte especificamente, aufere um aumento na bioatividade, não pondo em causa a viabilidade do produto. A fase cristalina $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Si}_6\text{O}_{16}$, não compromete o material não tendo qualquer tipo de influência na sua bioatividade. No entanto, havendo existência de fases cristalinas, embora o material continue a ser apelidado de vidro bioativo, é na realidade um vitro-cerâmico. Com a análise de DRX feita antes de submeter a amostra à etapa de sinterização (onde se obteve um difratograma com uma curva característica de material amorfo), conclui-se que a formação de fases cristalinas está diretamente relacionada com a temperatura usada no tratamento térmico efetuado. De acordo com a literatura, este resultado seria expectável, havendo referência à cristalização deste tipo de materiais a temperaturas superiores a $600\text{ }^\circ\text{C}$. Em termos de DRX não há restrições para o uso do material como revestimento.

Os pós foram de seguida sujeitos a ensaios de citotoxicidade para avaliar o seu comportamento em meio biológico. As análises de citotoxicidade foram feitas para diferentes concentrações do material produzido. C_0 corresponderia a um revestimento feito exclusivamente de vidro bioativo, o que não vai de encontro aos objetivos pretendidos. Posto isto, após a análise das absorvâncias dos poços da microplaca, constatou-se que para C_0 e $C_0/2$ (que não serão postas em prática) o resultado deu citotóxico. Contudo, para as restantes, o material é sempre não citotóxico promovendo a proliferação das células. Quer isto dizer que o vidro bioativo produzido é efetivamente biocompatível, reagindo com o meio biológico de uma maneira que promove o crescimento e reprodução celular. Assim, após a bateria de ensaios realizados aos pós, conclui-se que o material não apresenta restrições no que toca ao seu uso como revestimentos, demonstrando que é possível produzir com sucesso, através do processo de sol-gel, vidros bioativos.

O revestimento foi então realizado através da técnica de CoBlast™. Foram então revestidas placas de Ti-6Al-4V com 3 misturas diferentes. Após o revestimento, as amostras foram analisadas com recurso a SEM, EDS e a ensaios de adesão celular. As placas de Ti-6Al-4V sem revestimento foram também analisadas.

Os resultados de SEM demonstraram que o revestimento das placas foi bem sucedido, comprovando que todas as amostras apresentavam superfícies contínuas, sem fraturas ou falhas e com relativa homogeneidade. Numa primeira comparação, entre o revestimento de HAp e o revestimento com a mistura A (20% de vidro bioativo e 80% de HAp), foram evidentes algumas diferenças. Desde logo no que toca à rugosidade da superfície, onde a mistura A apresenta um revestimento visivelmente menos rugoso e mais homogéneo. Quando comparado com a mistura B (35% de vidro bioativo e 65% de HAp), observa-se uma diminuição mais acentuada da rugosidade da superfície, podendo-se concluir que o aumento da concentração de vidro bioativo no revestimento promove a formação de superfícies menos rugosas, bastante contínuas e homogéneas. A análise de EDS vem demonstrar mais uma vez o sucesso do processo de revestimento, havendo evidências da presença de HAp e de vidro bioativo na superfície da amostra, demonstrando que não houve perda de material no processamento e que este aderiu bem ao substrato. Foram posteriormente efetuados ensaios de adesão e proliferação celular às placas de Ti-6Al-4V sem revestimento e revestidas com HAp, com a mistura A e com a mistura B. As taxas de adesão celular foram obtidas relativamente às placas não revestidas. Deste modo, pode-se concluir que as placas revestidas com a mistura com maior concentração de vidro bioativo (mistura B) apresentam a maior taxa, com um aumento de 22% do número de células aderidas ao substrato quando comparado com as placas não revestidas. Seguem-se as placas revestidas com a mistura A, com um aumento de 19% e por último as revestidas com HAp que apresentam um decréscimo de 11%

do número de células aderidas ao revestimento. Em termos de proliferação celular, conclui-se que a amostra revestida com a mistura B é a que apresenta piores taxas de proliferação sendo explicado por, numa fase inicial, devido à maior concentração de vidro bioativo que, numa fase inicial na formação da camada de *HCA*, promove um aumento de pH devido às trocas iónicas entre o revestimento e o meio. Nos restantes dias, esta amostra evidencia uma boa proliferação celular, acabando por promover a reprodução celular, chegando-se ao fim do 9º dia de ensaios com um aumento de 149% do número de células em relação ao 1º dia. É, no entanto, a mistura com menor concentração de vidro bioativo (mistura A) que apresenta melhor taxa de proliferação, apresentando valores superiores em todos os dias quando comparado com os outros revestimentos e chegando ao fim do 9º dia com uma taxa de proliferação bastante alta, de 203%. Quando comparado com o primeiro dia, as placas sem revestimento apresentam o maior aumento, com 276%, seguido das revestidas com a mistura A (20% de vidro bioativo e 80% de HAp) com 203% (mesma que as revestidas só com HAp).

No término de todos os ensaios é possível concluir que é possível produzir pós de vidro bioativo através do método de sol-gel e estes apresentam resultados bastante satisfatórios, sendo portanto uma alternativa bastante capaz e efetivamente mais económica. Em relação à técnica de revestimento de CoBlast™, ficou demonstrado que se podem obter revestimentos resistentes, com baixa rugosidade e elevada homogeneidade. Os resultados permitem também concluir que os revestimentos feitos com os pós produzidos apresentam uma boa bioatividade e biocompatibilidade e que promovem de uma forma benéfica a adesão e proliferação celular. Embora os revestimentos com a mistura B demonstrem uma maior taxa de adesão esta diferença não é significativa. No que diz respeito às taxas de proliferação, são os revestimentos com a mistura A que apresentam melhores valores, podendo-se concluir que esta mistura tem melhores desempenhos em meio biológico.

Tendo em conta os resultados, é assim possível concluir que este método de produção de pós e esta técnica de revestimento apresentam boas possibilidades, no futuro, de aplicabilidade em situação real. Tendo em conta que na técnica de revestimentos mais usada, spray térmico na variante de plasma, há um elevado custo energético associado, embora não hajam valores que possam comparar e comprovar é possível dizer, à partida, que a técnica de CoBlast™ apresenta um custo associado significativamente inferior. Além do benefício económico, é de extrema importância também salientar que o fato de a técnica de CoBlast™ ser feita à temperatura ambiente é uma grande vantagem neste tipo de processos. Isto porque, não envolvendo altas temperaturas não induz alterações de fase no material a ser depositado, o que garante que o produto presente no revestimento é o mesmo. Para que seja alvo de uso, será certamente ideal proceder-se a

uma análise de diferentes concentrações e composições do vidro bioativo de forma a melhorar ainda mais as propriedades já evidenciadas pelo produto produzido.

5 Referências

- [1] Dee, K. C., Puleo, D. A., Bizios R. (2002). *An Introduction to Tissue - Biomaterial Interactions*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc..
- [2] Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials Science: An Introctution to Materials in Medicine*, 2nd Edition. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- [3] E. Rezabeigi et al. /Materials Science and Engineering C 40 (2014) 248–252.
- [4] Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002;295:1014–7.
- [5] Fetner AE, Low SB, Wilson J, Hench LL. Histologic evaluation of bioglass particulates in gingival tissue. *J Dent Res* 1987;66:298–398.
- [6] Julian R. Jones. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids. *Acta Biomaterialia* 23 (2015) S53-S82
- [7] Rust KR, Singleton GT, Wilson J, Antonelli PJ. Bioglass middle ear prosthesis: long-term results. *Am J Otolaryngol* 1996;17:371–4.
- [8] Li R, Clark AE, Hench LL. An investigation of bioactive glass powders by sol– gel processing. *J Appl Biomater* 1991;2:231–9.
- [9] Lopez-Esteban S, Saiz E, Fujino S, Oku T, Suganuma K, Tomsia AP. Bioactive glass coatings for orthopedic metallic implants. *J Eur Ceram Soc* 2003;23:2921–30.
- [10] P. Li, F. Zhang, and T. Kokubo. The Effect of Residual Glassy Phase in a Bioactive Glass–Ceramic on the Formation of its Surface Apatite Layer in vitro. *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 3 452–6 (1992).
- [11] Hench LL. Bioglass: 10 milestones from concept to commerce, *Journal of Non-Crystalline Solids* 432 (2016) 2-8; Elsevier B. V.
- [12] Hench LL, West JK. The sol–gel process. *Chem Rev* 1990;90:33–7.
- [13] Luqman A. Adams, Enobong R. Essien, Rafiu O. Shaibu, Aderemi Oki. Sol-Gel Synthesis of SiO₂-CaO-Na₂O-P₂O₅ Bioactive Glass Ceramic from Sodium Metasilicate, *New Journal of Glass and Ceramics*, 2013, 3, 11-15.

- [14] Siqueira RL, Peitl O, Zanotto ED. Gel-derived SiO₂–CaO–Na₂O–P₂O₅ bioactive powders: synthesis and in vitro bioactivity. *Mater Sci Eng, C* 2011;31:983–913.
- [15] Sepulveda P, Jones JR, Hench LL. Bioactive sol–gel foams for tissue repair. *J Biomed Mater Res* 2002;59:340–8.
- [16] http://beta.rodpub.com/uploads/MDN/29194DS_CoBlast_Surface_Modification_Technology.pdf (visto a 22 de Janeiro de 2016).
- [17] A.M. Oladoye, J.G. Carton, A.G. Olabi. Characterization of Graphite Coatings Produced by CoBlast™ Technology. *JOM*, Vol. 66, No.4, 2014. The Minerals, Metals & Materials Society.
- [18] Riss, T. L., Niles, A. L., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual*, 1–23. doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006.
- [19] J. Faure, R. Drevet, A. Lemelle, N. Ben Jaber, A. Tara, H. El Btaouri, H. Benhayoune. A new sol-gel synthesis of 45S5 bioactive glass using an organic acid as catalyst. *Materials Science and Engineering C* 47 (2015) 407-412.
- [20] T. Sopcak, L. Medvecky, V. Girman. Mechanism of precipitation and phase composition of CaO–SiO₂–P₂O₅ systems synthesized by sol-gel method. *Journal of Non-Crystalline Solids* 415 (2015) 16-23. Elsevier B. V..
- [21] Ma J, Chen C Z, Wang D G, Meng X G and Shi J Z 2010 *J. Sol–Gel Sci. Technol.* 54 69–76.
- [22] Hong Z, Reis R L and Mano J F 2009 *J. Biomed. Mater. Res. A* 88A 304–13.
- [23] Ehsan Rezabeigi, Paula M. Wood-Adams, Robin A.L. Drew. Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol-gel process. *Materials Science and Engineering C* 40 (2014) 248-252.
- [24] O. Peitl, E. D. Zanotto and L. L. Hench, “Highly Bioactive P₂O₅–Na₂O–CaO–SiO₂ Glass-Ceramics,” *Journal of Non-Crystalline Solids*, Vol. 292, No. 1-3, 2001, pp. 115-126.
- [25] D. C. Clupper, J. J. Mecholsky, G. P. LaTorre and D. C. Greenspan, “Bioactivity of Tape Cast and Sintered GlassCeramics in Simulated Body Fluid,” *Biomaterials*, Vol. 23, No. 12, 2002, pp. 2599-2606.
- [26] Gisela M. Luz, João F. Mano. Preparation and characterization of bioactive glass nanoparticles prepared by sol-gel for biomedical applications. *Nanotechnology* 22 (2011) 494014 (11pp).
- [27] Bellantone M and Hench L L 2000 *Bioceramics* 192–1 617–20.

[28] S. Pourhashem, A. Afshar. Double layer bioglass-silica coatings on 316L stainless steel by sol-gel method. *Ceramics International* 40 (2014) 993-1000.

6 Anexos

6.1 Anexo 1 – Resultados dos ensaios de EDS

Neste anexo serão expostas as imagens de SEM e respectivos espectros.

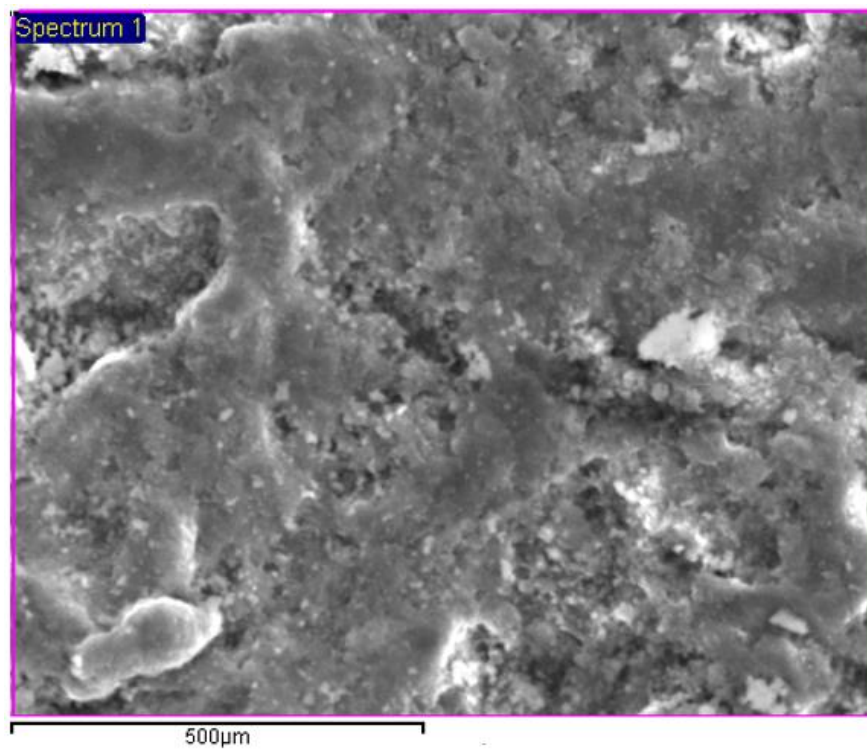


Figura 6.1 – Imagem de SEM da amostra revestida com HAp. Espectro retirado encontra-se na figura 3.4 da página 22.

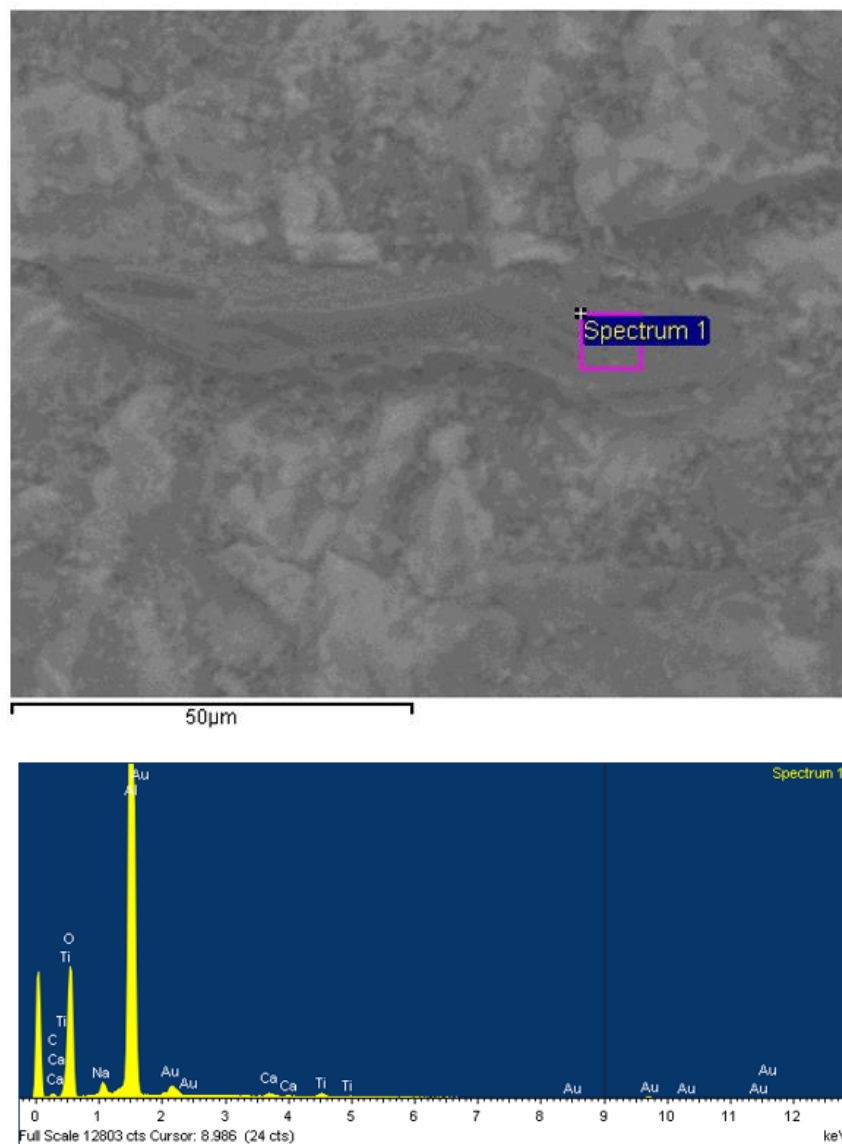


Figura 6.2 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “*Spectrum 1*”).

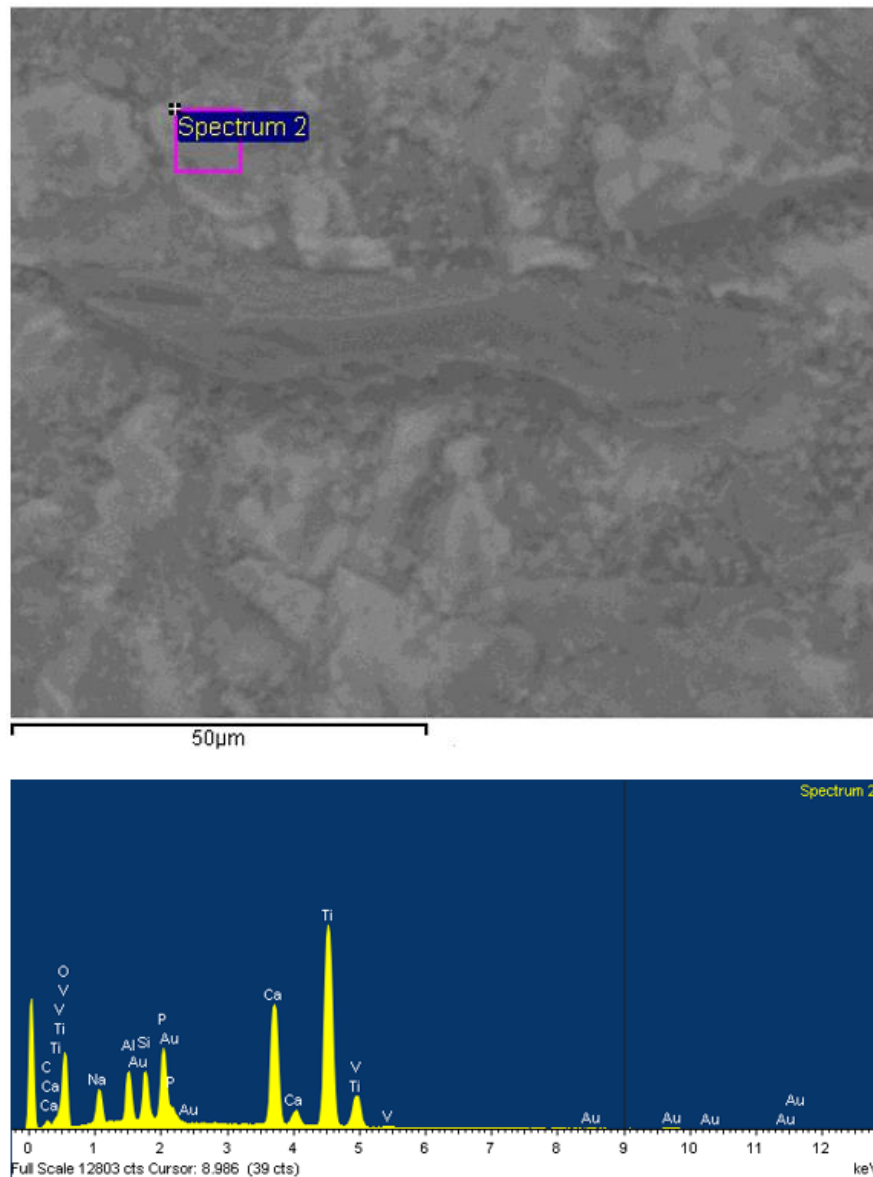


Figura 6.3 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “*Spectrum 2*”).

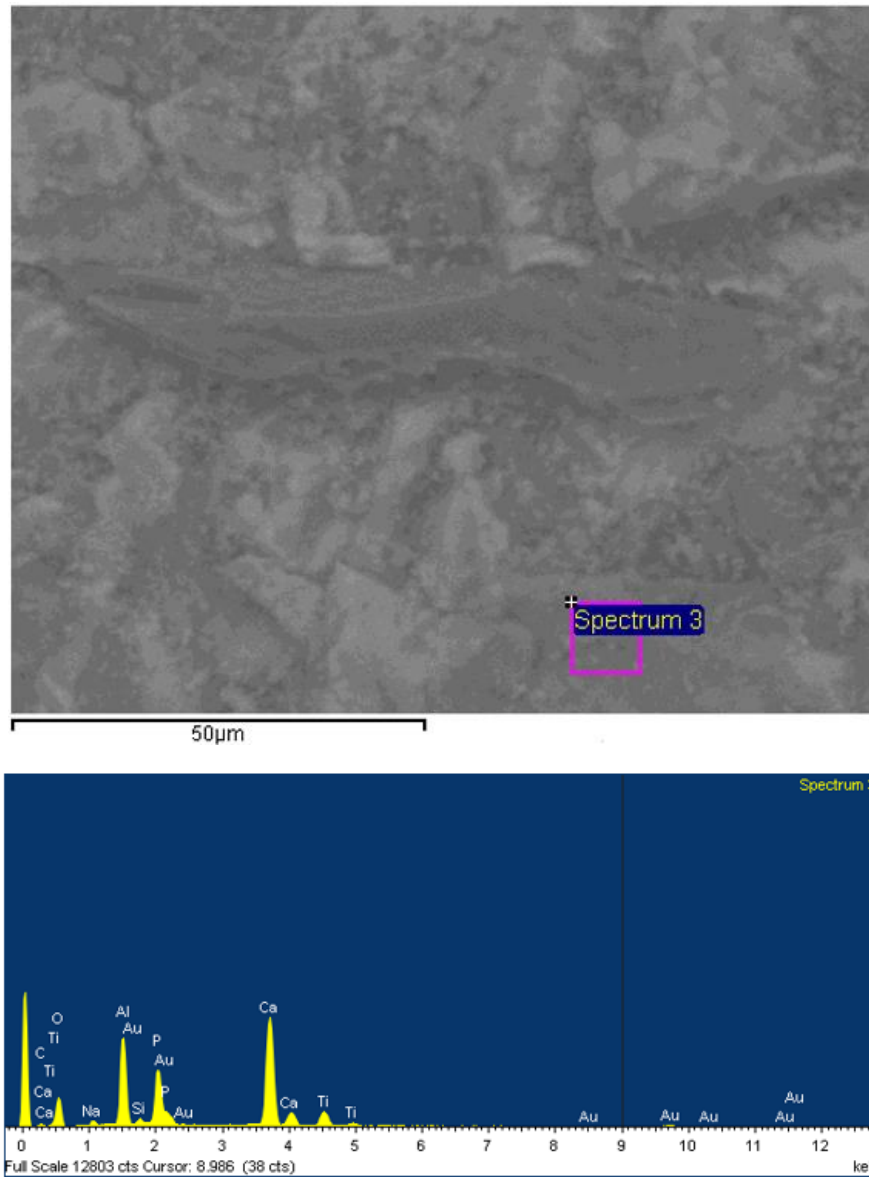


Figura 6.4 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “*Spectrum 3*”).

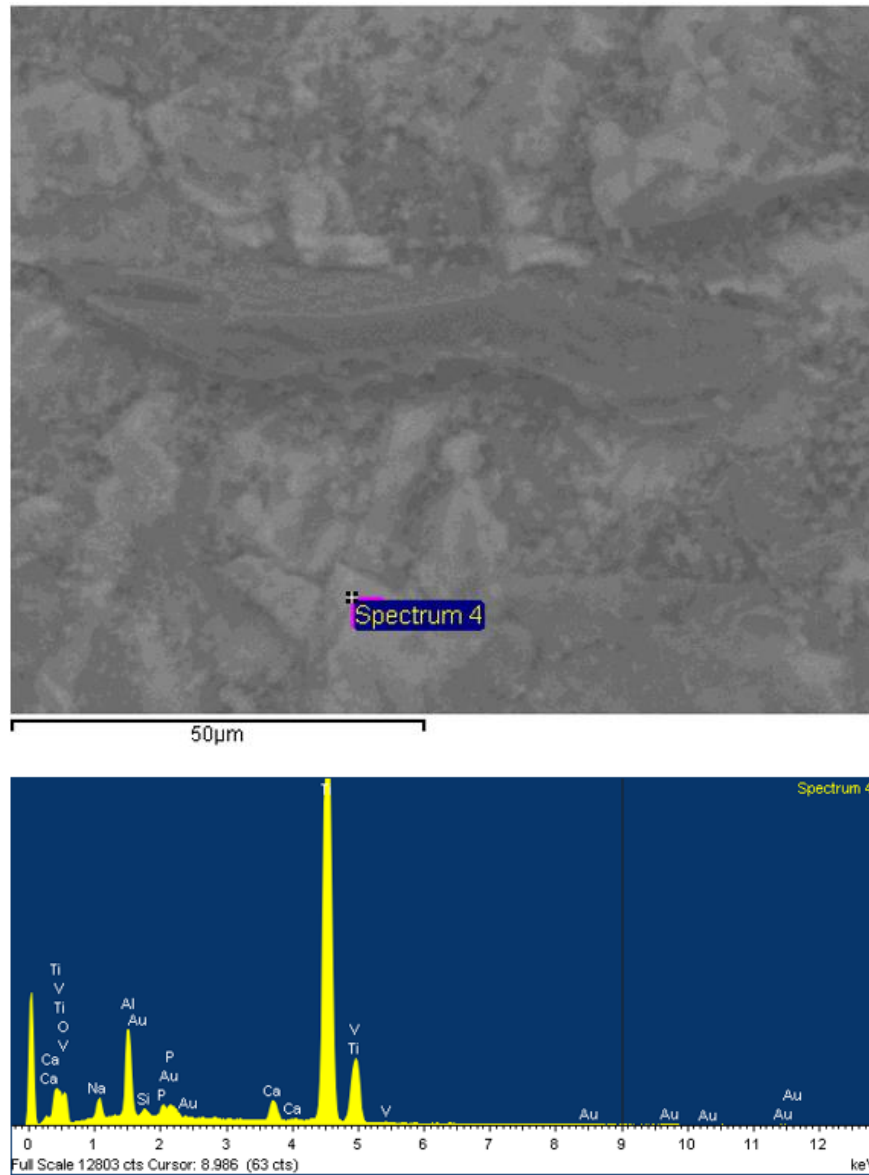


Figura 6.5 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioativo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “*Spectrum 4*”).

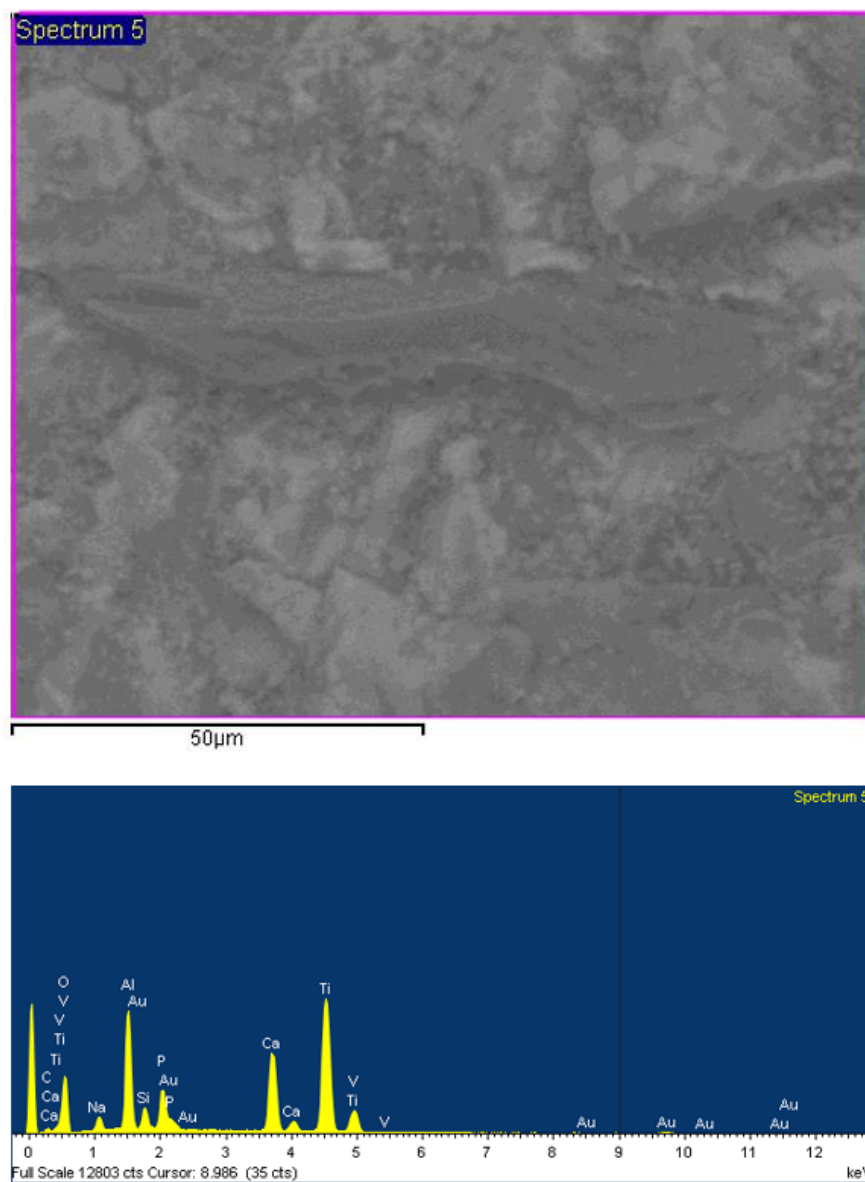


Figura 6.6 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioativo e 65% de HAp. O espectro encontra-se na figura 3.6 da página 24.

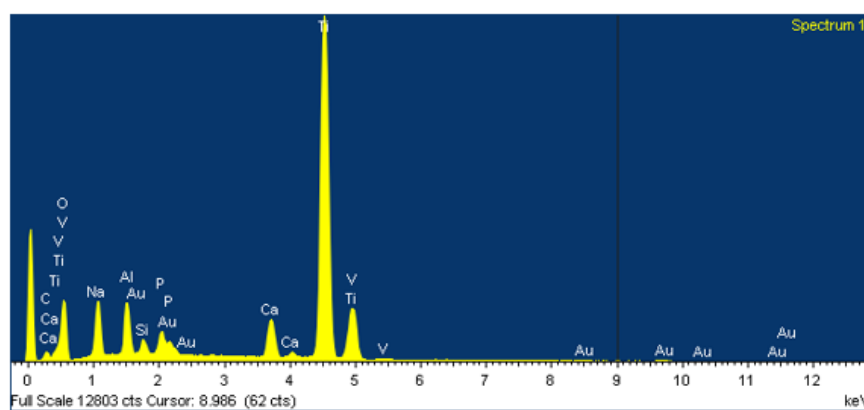
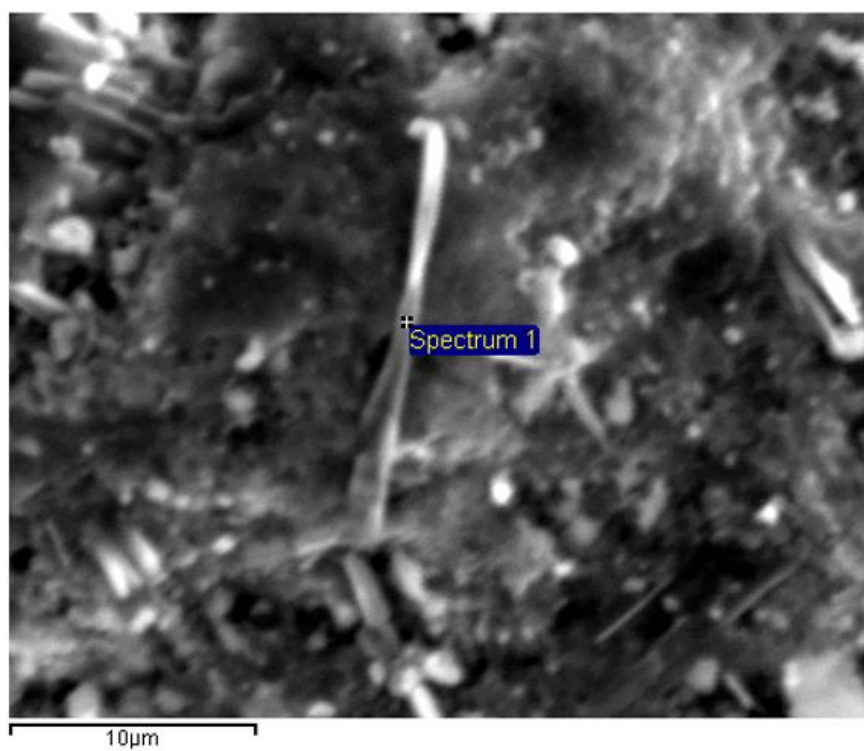


Figura 6.7 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “*Spectrum 1*”).

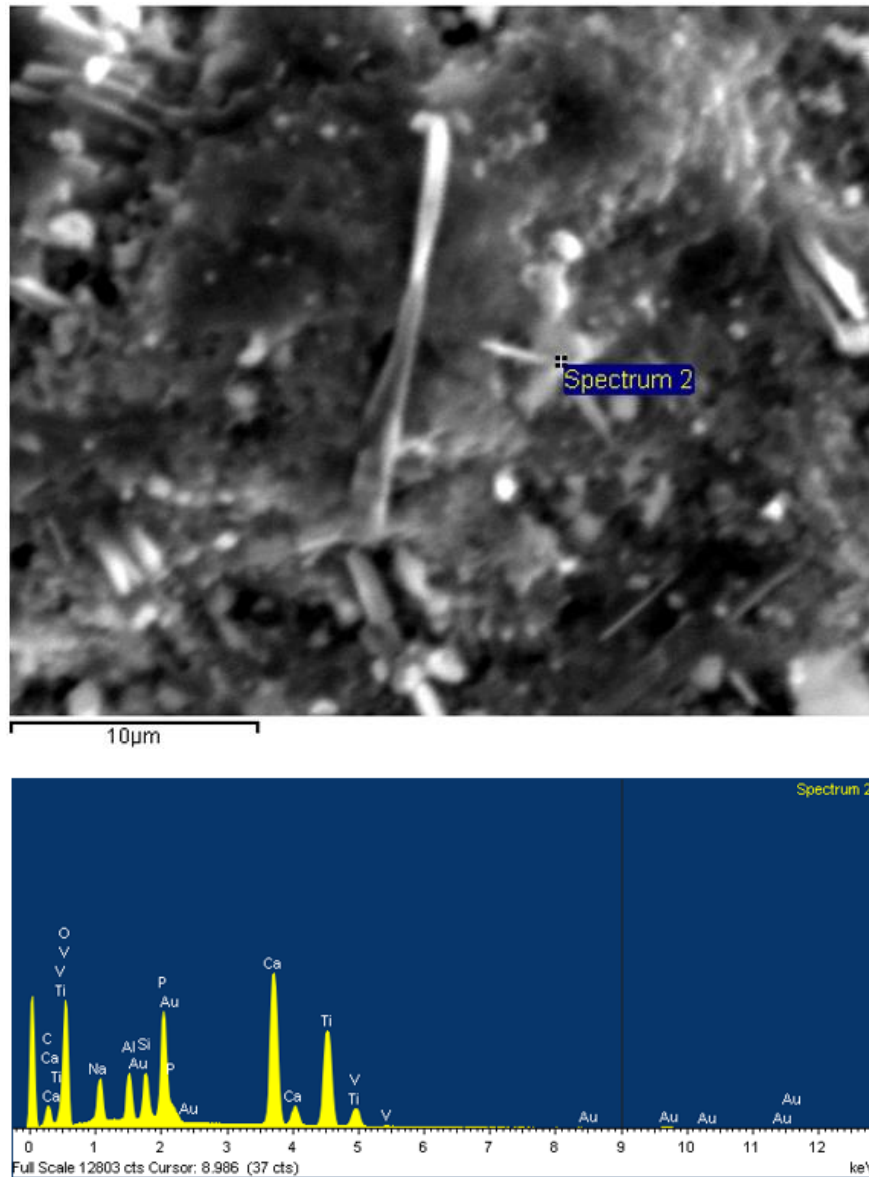


Figura 6.8 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioativo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “*Spectrum 2*”).

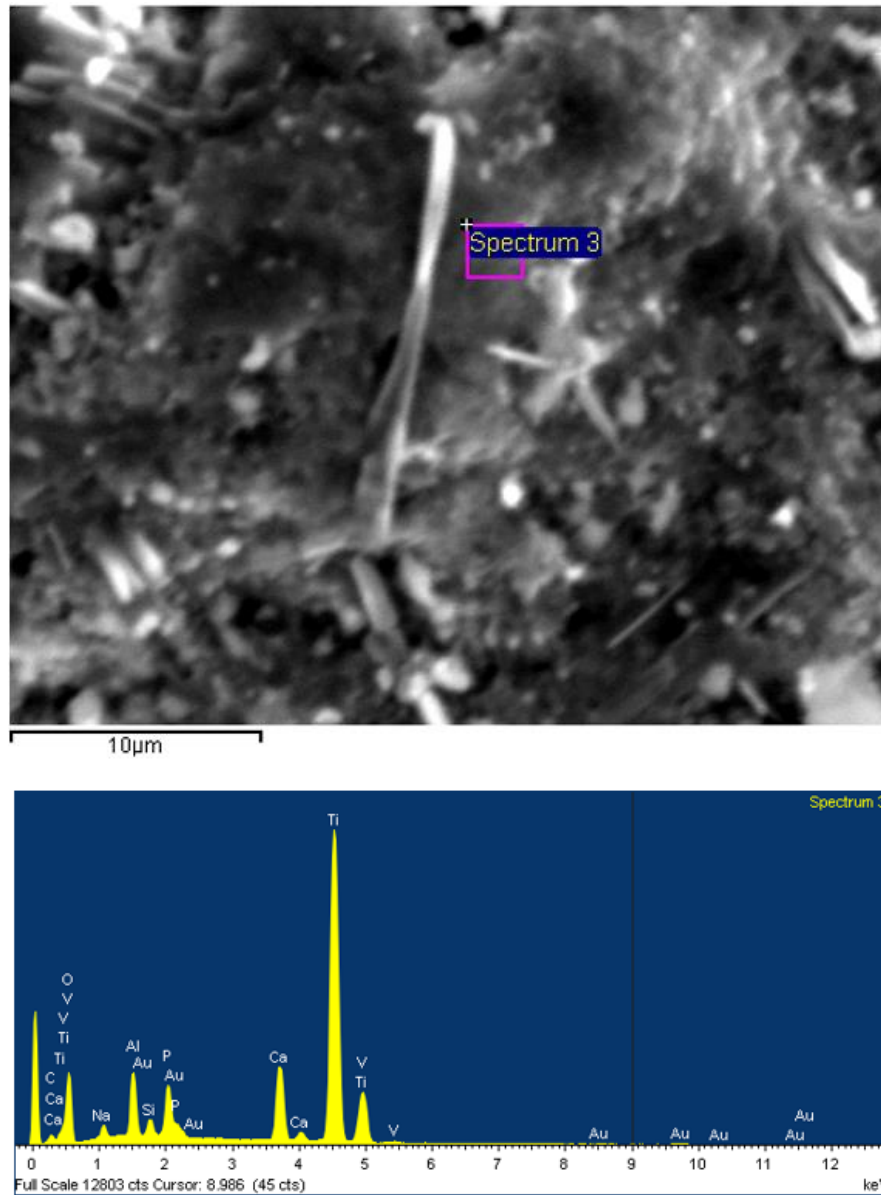


Figura 6.9 – Imagem de SEM da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp com respectivo espectro retirado da área “*Spectrum 3*”).

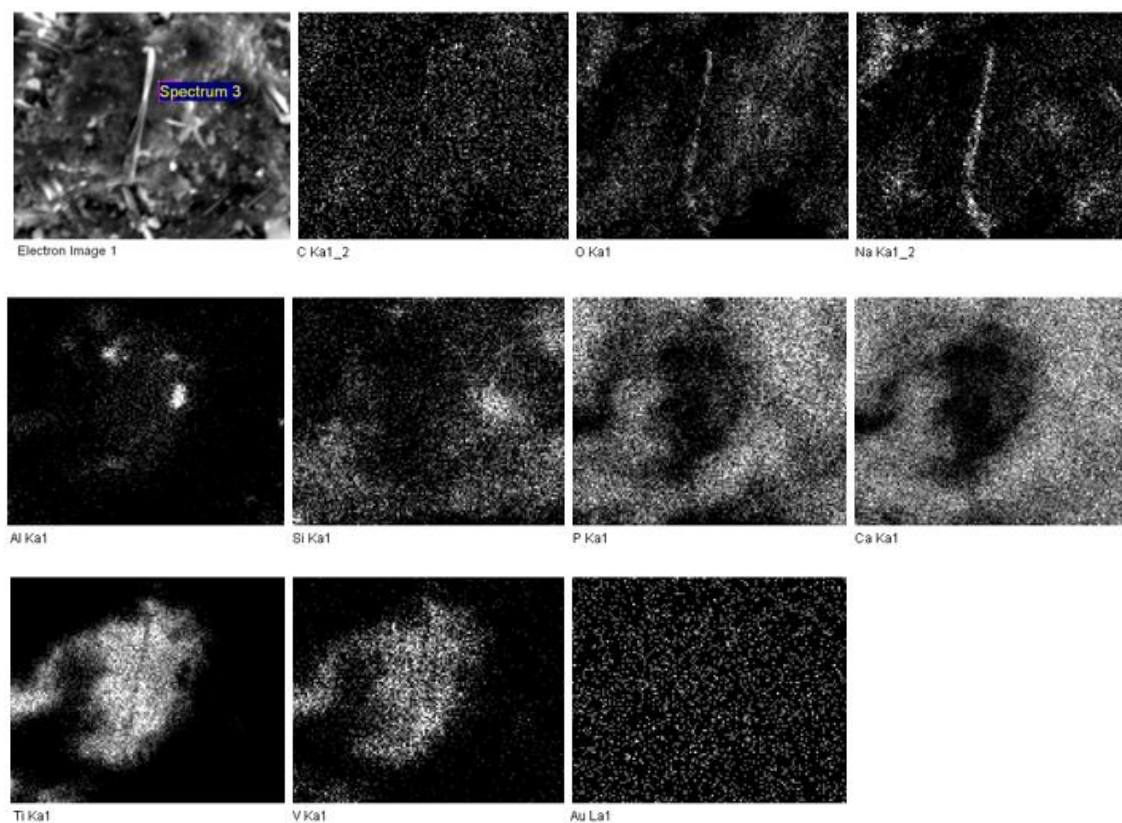


Figura 6.10 – Mapeamento da amostra revestida com 35% de vidro bioactivo e 65% de HAp.

